

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DETERMINAÇÃO DO SISTEMA DE
CRUZAMENTO DE *Elionurus muticus*

Ana Paula Durand Coelho
Eng.^a Agrônoma/UFSM
Mestre em Agrobiologia/UFSM

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do grau de Doutora em Fitotecnia
Ênfase Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre (RS) Brasil
Fevereiro de 2018

ANA PAULA DURAND COELHO
Engenheira Agrônoma - UFSM
Mestre em Agrobiologia - UFSM

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTOR EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 28.02.2018
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 03.07.2018
Por

JOSÉ FERNANDES BARBOSA NETO
Orientador - PPG Fitotecnia
UFRGS

CHRISTIAN BREDEMEIER
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

MAGNÓLIA APARECIDA SILVA DA SILVA
PPG Fitotecnia/UFRGS

FERNANDA BERED
PPG em Genética e Biologia Molecular
UFRGS

CLAUDIA ERNA LANGE
Oryza e Soy Pesquisa e
Consultoria Agronômica Ltda

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade
de Agronomia

CIP - Catalogação na Publicação

Coelho, Ana Paula Durand
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DETERMINAÇÃO DO
SISTEMA DE CRUZAMENTO DE *Elionurus muticus* / Ana
Paula Durand Coelho. -- 2018.

118 f.

Orientador: José Fernandes Barbosa Neto.

Coorientadora: Ingrid Bergman Inchausti Barros.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Plantas medicinais e aromáticas. 2. Sistema de
cruzamento. 3. Óleo essencial. 4. Viabilidade de
sementes. 5. Caracterização . I. Barbosa Neto, José
Fernandes, orient. II. Barros, Ingrid Bergman
Inchausti, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

"TALVEZ NÃO TENHA CONSEGUIDO FAZER O
MELHOR, MAS LUTEI PARA QUE O MELHOR FOSSE
FEITO.
Não sou o que deveria ser, mas graças a
Deus, não sou o que era antes".

(MARTIN LUTHER KING)

Dedico
Aos meus esteios e lado forte, Cleci Durand Coelho (*in
memorian*) e Alberto R. L. Coelho.
Sem vocês não teria chegado até aqui!

"SEM AMOR, EU NADA SERIA ..."

AGRADECIMENTO

Aos meus pais, Cleci (*in memoriam*) e Alberto, que sempre foram incentivadores e investidores de meus estudos. E o amor deles me fez chegar até esse momento.

À minha mãe, por toda dedicação que me foi dada. E que mesmo não estando presente fisicamente em minhas conquistas, esteve, está e estará em meu pensamento e coração. Ao Déda, que nos últimos anos se tornou um grande “pãe”, amigo, dedicado e atencioso. As minhas irmãs, em especial a “ermã-menor” Raquel, a gente briga, mas se ama.

Ao meu orientador, Dr. José Barbosa (Zé), por ter me dado a oportunidade de realizar o doutorado, espero que não tenha se arrependido de ter me ligado ;) . Entre trancos e barrancos, nosso querido Capim-limão floresceu!

À minha coorientadora, Dra. Ingrid Barros pelas conversas, ideias e saída para coletas. Às professoras, Dra. Fernanda Bered e Dra. Renata Cruz pelas conversas e ideias para a tese.

Aos Professores, Dr. Maurício Sedrez dos Reis, Dra. Alexandra Mastroberti e Dra Lucia Brandão Franke, pela ajuda com ideias e análises em suas respectivas áreas. Aos alunos do professor Maurício, em especial ao Tiago Montagna, pela disponibilidade e ajuda nas análises isoenzimáticas.

À Thanise Füller e colegas anteriores que deram início ao trabalho e realizaram as primeiras coletas, me possibilitando o prosseguimento.

Aos laboratoristas, funcionários e secretárias do PPG Fitotecnia, Plantas e Horti pelas ajudas de sempre, ao pessoal da Horticultura por ceder o lab. para a realização das extrações de óleo. Aguentando as inúmeras horas de cheiro de capim limão, vou sentir falta da pergunta mais feita: -Que cheirinho é esse?

Aos colegas de jornada do Dep. Plantas de Lavoura, em especial, Giliardi, Pisoni, Andrew, Tiago, Gabriele, Galon, Luan, Carlos, Silmara, André, Carol, Cátia e Ernandes, pelas conversas, reclamações, ideias, risadas, alguns happys no mato e principalmente, pela ajuda que sempre me deram quando mais precisei. Gracias! Os capins agradecem algumas irrigações, e eu também.

Às garotas, Yohanna, Carol, Liliana, Geísa, Leise e Indianara, que bom que nossos caminhos se cruzaram, vocês me ajudaram muito nessa caminhada.

Aos meus queridos amigos de Santa Maria, que entenderam as minhas ausências. Á minha Best, Andrea, que sempre tinha uma palavra de ajuda nos momentos mais nebulosos. Saudades das nossas mil horas de papos.

Ao meu querido “*roommate*” Luva por trazer sorrisos e leveza aos meus dias, e ter me apresentado aos amigos “Cachorreiros da Redenção”, Cati, Lis e Cema, que contribuíram muito em manter a minha sanidade mental e a ter momentos de descontração.

À CAPES pela bolsa concedida.

E a todos que de alguma forma fizeram parte dessa conquista.

Muito Obrigada!

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DETERMINAÇÃO DO SISTEMA DE CRUZAMENTO DE *Elionurus muticus*¹

Autora: Ana Paula Durand Coelho

Orientador: José Fernandes Barbosa Neto

Coorientadora: Ingrid Bergman Inchausti de Barros

RESUMO

Elionurus muticus (Spreng.) Kunth é uma gramínea nativa do bioma Pampa, conhecida popularmente como “capim limão”, que apresenta atividade antioxidante, sendo utilizado como planta medicinal e aromática. A espécie tem se destacado por ser uma possível fonte natural de citral. O citral é um composto de grande interesse econômico, pois é amplamente empregado na indústria, principalmente farmacêutica, já que serve como matéria prima para a síntese de vitamina A. No entanto, são escassos os trabalhos realizados com a espécie, principalmente aqueles que têm como objetivo o melhoramento genético. Devido a isso, os objetivos desse trabalho foram determinar o sistema de cruzamento da espécie, realizar a caracterização botânica e agrônômica da inflorescência, das sementes e de indivíduos de uma população originária do município de São Borja/RS, com intuito de iniciar o melhoramento genético da espécie visando o aumento do teor de óleo essencial. A determinação do sistema de cruzamento, através de progênie conhecida, foi realizado pelo uso de marcadores isoenzimáticos. Inflorescências foram coletadas para analisar as estruturas e os estádios do florescimento, e sementes para verificar a viabilidade e germinação. Além disso, os indivíduos foram caracterizados e selecionados por apresentarem maior produção de biomassa. A partir dos resultados foi possível determinar que a espécie é alógama preferencial. Há presença de pálea nas espiguetas, a duração do florescimento é de aproximadamente 30 dias, ocorrendo nos meses de janeiro e fevereiro. As sementes foram viáveis e vigorosas, com elevada porcentagem de germinação. A temperatura ótima para germinação foi de 25° C, na qual as sementes apresentaram maior porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e tempo médio de germinação. A poda de 150 dias apresentou ser a mais adequada em relação à produção de biomassa da parte aérea. A partir da extração de óleo essencial dos indivíduos selecionados foi possível verificar que os teores e o rendimento de óleo essencial variaram de 0 a 0,52% e 0 a 7,2 mL/planta, respectivamente, sendo similares aos teores obtidos em outras espécies do gênero *Elionurus*. A produção de biomassa da parte aérea apresentou uma correlação (0,79) com o rendimento de óleo essencial, indicado que para fins do melhoramento genético de *E. muticus* a seleção de indivíduos promissores deve focar no alto rendimento de biomassa da parte aérea, teor e rendimento de óleo essencial.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (118 f.) Fevereiro. 2018.

PHENOTYPICAL CHARACTERIZATION AND MATING SYSTEM DETERMINATION OF *Elionurus muticus*²

Author: Ana Paula Durand Coelho
Advisor: José Fernandes Barbosa Neto
Co-advisor: Ingrid Bergman Inchausti de Barros

ABSTRACT

Elionurus muticus (Spreng.) Kunth is a native grass of the Pampa biome, popularly known as "lemon grass". It has antioxidant activity and it is used as a medicinal and aromatic plant. This species has been noted for being a possible natural source of citral. The citral is a compound of large economic interest, since it is widely used in industry, mainly pharmaceutical. It is used as raw material for the synthesis of vitamin A. However, the work done for characterization with the species is scarce. Due to this, the objectives of this work were to determine the mating system of the species, to perform the botanical and agronomic characterization of the inflorescence, seeds and individuals of a population originally from the municipality of São Borja / RS. The determination of the mating system, through progeny test, was performed using isoenzymatic markers. Inflorescences were collected to analyze the structures and stages of flowering, and seeds to verify viability and germination. In addition, individuals were characterized and selected because they presented higher biomass production. From the results it was possible to determine that the species is preferential alogamous. There is presence of palea in the spikelets, the duration of the flowering was approximately 30 days, occurring in the months of January and February. The seeds were viable and vigorous, with a high percentage of germination. The optimum temperature for germination was 25° C, in which the seeds showed a higher percentage of germination, germination speed index and average germination time. The pruning of 150 days showed to be the most adequate in relation to the biomass production of the aerial part. From the extraction of essential oils from the selected individuals, it was possible to verify that the contents and yields of essential oil varied from 0 to 0.52% and 0 to 7.2 mL / plant, respectively, being similar to the contents obtained in other species of the genus *Elionurus*. The biomass yield of the aerial part showed a correlation (0.79) with the yield of essential oil, indicated that for purposes of genetic improvement of *E. muticus* the selection of promising individuals should focus on the high yield of shoot biomass.

² Doctoral thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (118 p.) February, 2018.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	3
2.1 <i>Elionurus muticus</i> (Spreng.) Kuntze.....	3
2.2 Caracterização morfológica e agrônômica.....	4
2.3 Óleo essencial	7
2.4 Viabilidade das sementes	9
2.5 Sistema de cruzamento	11
2.6 Isoenzimas.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Germoplasma	15
3.2 Métodos	15
3.2.1 Avaliação botânica e desenvolvimento das inflorescências	15
3.2.2 Caracterização e viabilidade das sementes.....	16
3.2.3 Determinação do sistema de cruzamento de <i>E. muticus</i>	20
3.2.4 Avaliação da propagação vegetativa: perfilhamento	27
3.2.5 Avaliação da relação biomassa, peso de biomassa e tempo de extração do óleo essencial	28
3.2.6 Caracterização fenotípica dos indivíduos da população.....	29
3.2.7 Extração do óleo essencial.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Avaliação botânica.....	32
4.2 Desenvolvimento das inflorescências	36
4.3 Caracterização e viabilidade das sementes.....	42
4.3.1 Caracterização.....	42
4.3.2 Germinação e vigor	43
4.4 Determinação do sistema de cruzamento de <i>E. muticus</i>	57
4.4.1 Determinação do protocolo isoenzimático para a espécie <i>E. muticus</i>	57
4.4.2 Determinação do sistema de cruzamento de <i>E. muticus</i> através de isoenzimas.....	60
4.4.3 Determinação do sistema de cruzamento através do isolamento de inflorescências.....	65
4.5 Avaliação da propagação vegetativa: perfilhamento.....	66

	Página
4.6 Avaliação da relação tipo de biomassa, peso de biomassa e tempo de extração	69
4.7 Avaliação fenotípica dos indivíduos da população.....	76
4.8 Extração de óleo essencial dos indivíduos selecionados	79
5 CONCLUSÕES	84
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Sistemas enzimáticos testados em <i>Elionurus muticus</i> . Porto Alegre/RS. 2017.	22
2. Sistemas tampão gel/eletrodo e condições de corrida, empregados no estabelecimento de protocolo de isoenzimas para <i>Elionurus muticus</i> . Porto Alegre/RS. 2017.....	23
3. Número de inflorescências coletadas por dia, número total de sementes trilhadas e número médio de sementes por inflorescência de <i>Elionurus muticus</i> , origem São Borja/RS, cultivadas em casa de vegetação. Porto Alegre/RS. 2017.	42
4. Porcentagem de germinação (%G), tempo inicial de germinação (Ti), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG) das sementes de <i>Elionurus muticus</i> submetidas a diferentes temperaturas e luminosidade. Porto Alegre/RS. 2017.....	45
5. Médias do número de plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), sementes duras (SD) e sementes murchas (SM) obtidas de sementes de <i>Elionurus muticus</i> , submetidas à germinação em diferentes temperaturas e luminosidade. Porto Alegre/RS. 2017.....	52
6. Médias do comprimento de plântulas (CP), comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) obtidas de sementes de <i>Elionurus muticus</i> , submetidas à germinação em diferentes temperaturas e luminosidade. Porto Alegre/RS. 2017.....	53
7. Sistemas enzimáticos testados em tampão de corrida Tris-citrato em folhas coletadas de matrizes e progênies, diferentes formas de armazenamento, para o protocolo isoenzimático em <i>Elionurus muticus</i> . Porto Alegre/RS. 2017.....	58
8. Sistemas enzimáticos testados em tampão de corrida Tris-Citrato (CT) e tampão de corrida Citrato de morfolina (CM) para protocolo isoenzimático de <i>Elionurus muticus</i> . Porto Alegre/RS. 2017.....	59
9. Sistemas enzimáticos utilizados em <i>Elionurus muticus</i> . Porto Alegre/RS. 2017.	60
10. Taxa individual de cruzamento multiloco e uniloco por família de <i>Elionurus muticus</i> , através de análise isoenzimática. Porto Alegre/RS. 2017.	62

	Página
11. Estimativas dos parâmetros associados ao sistema reprodutivo de <i>Elionurus muticus</i> , através de análise isoenzimática. Porto Alegre/RS. 2017.	63
12. Número médio de sementes por inflorescência de <i>Elionurus muticus</i> a partir de flores não protegidas (Livre) e protegidas por ensacamento. Porto Alegre/RS. 2017.....	65
13. Porcentagem de pegamento, altura de planta e biomassa fresca das folhas (BFF), de <i>Elionurus muticus</i> em função do número de perfilhos inicial. Porto Alegre/RS.2017.....	67
14. Resumo da análise de variância do volume (Vol), teor e rendimento de óleo essencial (Rend) de <i>Elionurus muticus</i> em relação ao tipo de biomassa, peso de biomassa e tempo de extração por hidrodestilação. Porto Alegre/RS. 2017.....	69
15. Médias do volume, teor e rendimento de óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> em relação ao peso de biomassa e tempo de extração. Porto Alegre/RS. 2017.	70
16. Médias do volume, teor e rendimento de óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> da interação entre tipo de biomassa e peso de biomassa da parte aérea. Porto Alegre/RS. 2017.	71
17. Resumo da análise de variância da altura e biomassa dos indivíduos de <i>Elionurus muticus</i> , população São Borja/RS. Porto Alegre/RS. 2017.	76
18. Máxima, mínima e média geral da altura e biomassa da parte aérea de <i>Elionurus muticus</i> . Porto Alegre/RS. 2017.....	77
19. Valores médios de presença ou ausência de odor cítrico, altura de planta, biomassa fresca da parte aérea (g/planta), volume (mL/30g), teor (%) e rendimento (mL/planta) de óleo essencial de 11 indivíduos de <i>Elionurus muticus</i> , população São Borja, cultivados em casa de vegetação. Porto Alegre/RS. 2017.	81
20. Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis analisadas em <i>Elionurus muticus</i> . Porto Alegre/RS. 2017.....	84

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

1. Inflorescências de *Elionurus muticus*: a) inflorescências no ápice do colmo florífero; b) seta indica inflorescência secundária intermediária no colmo florífero; c) inflorescência pilosa. Porto Alegre/RS. 2017.33
2. Espiguetas com flores completas de *Elionurus muticus*: a) seta indica aristas; b) seta indica lodícula; c) seta indica estigma plumoso; d) 1- estigmas plumosos; 2- lema e aristas; 3- pálea; 4- anteras. Porto Alegre/RS. 2017.34
3. Estádios do florescimento de *Elionurus muticus*; a) Início da emissão do primórdio da inflorescência; b) segundo dia após a emissão inicial; c) terceiro dia após a emissão inicial; d) quinto dia após a emissão inicial (iniciando antese); e) oitavo dia após a emissão inicial e em destaque inflorescência em antese; f) inflorescência em antese sequencial, iniciando no ápice; g) inflorescência com ápice disperso; h- i) inflorescências polinizadas, com frutos/sementes formados e em início de dispersão. Porto Alegre/RS. 2017.39
4. Número de inflorescências coletadas, número de sementes coletadas de *Elionurus muticus*, relacionadas com as temperaturas na casa de vegetação durante o período. Porto Alegre/RS. 2017.40
5. a) Diferenças na coloração das sementes de *Elionurus muticus*; b) Semente individual (C= comprimento; L= largura). Porto Alegre/RS. 2017.43
6. Comparação das porcentagens de germinação acumulada, porcentagens de germinação diária entre os tratamentos fotoblasto negativo (25°C+0hs de luz) e fotoblasto positivo (25°C+12hs de luz). Porto Alegre/RS. 2017.48

7. Plântulas de *Elionurus muticus*, após 15 dias de germinação das sementes submetidas a diferentes temperaturas e luminosidade. a) Plântula anormal (PA) e normal (PN) germinadas a temperatura alternada 20/30°C e fotoperíodo 8 horas na maior temperatura; b) Plântula anormal (PA) e normal (PN) germinadas a temperatura constante 30°C e fotoperíodo 12 horas; c) Plântulas normais germinadas a temperatura constante 25°C- seta indica plântula normal germinada sem incidência de luminosidade (fotoperíodo 0 horas); d) plântulas anormais germinadas a temperatura contante 25°C e fotoperíodo 12 horas (fotoblasto positivo); e) plântulas anormais germinadas a temperatura constante 25°C e fotoperíodo 0 horas (fotoblasto negativo); f) plântulas anormais germinadas a temperatura constante 30°C e fotoperíodo 12 horas. Porto Alegre/RS. 2017.51
8. Plântulas de *Elionurus muticus*, após 15 dias de germinação submetida a diferentes temperaturas e luminosidade. (Temperaturas 15°, 25° e 30°C – fotoperíodo 12 horas; temperatura alternada 20/30°C – fotoperíodo 8 horas; fotoblasto negativo – temperatura 25°C e fotoperíodo 0 horas). Setas indicam plântulas anormais, sem desenvolvimento de radícula. Porto Alegre/RS. 2017.55
9. Frequência relativa da germinação de sementes de *Elionurus muticus* submetidas a diferentes temperaturas e luminosidade. TMG=tempo médio de germinação (dias). Porto Alegre/RS. 2017.56
10. Volume de óleo extraído de *Elionurus muticus* em relação ao tipo e peso de biomassa da parte aérea. Porto Alegre/RS. 2017.....72
11. Relação tipo de biomassa, peso de biomassa e tempo de extração do óleo essencial de *Elionurus muticus*. Porto Alegre/RS. 2017.....75

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas aromáticas e medicinais pela população mundial é crescente e as substâncias químicas responsáveis pelo seu efeito terapêutico representam o ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos com grande importância agrônômica e econômica. Existem diversas formas de preparo, uso e obtenção de princípios ativos das plantas aromáticas e medicinais, sendo uma delas a extração do óleo essencial, o qual é sintetizado, armazenado e liberado por algumas espécies. Os óleos essenciais são líquidos voláteis dotados de aroma forte, característico e quase sempre agradável. De maneira geral, são misturas complexas e sua composição pode apresentar uma variação intra e interespecífica.

Os óleos essenciais são matérias-primas utilizadas pela indústria de perfumaria, que ocupam 14% do mercado de cosméticos no Brasil, como produtos de limpeza e na indústria de alimentos, além de serem também utilizados pela indústria química e de medicamentos. Os aromas e fragrâncias incorporadas nos alimentos, perfumes e cosméticos possuem alto valor no mercado mundial. O mercado mundial de óleos essenciais está avaliado em cerca de US\$ 20 bilhões ao ano, sendo que o Brasil está entre os 15 maiores exportadores de óleo essencial. A demanda global do mercado de óleo essencial foi de 178,8 toneladas em 2015 e

é estimado que exceda 370 toneladas até 2024, crescendo em torno de 8,4% de 2016 até 2024.

Elionurus muticus (Spreng.) Kunth é uma espécie da família Poacea, conhecida popularmente como “capim limão” ou “capim carona”. As plantas são perenes, nativas do bioma Pampa e rústicas, o que as torna um recurso potencial para exploração, através de cultivo. *E. muticus* apresenta atividade antioxidante devido ao conteúdo de seus compostos fenólicos, sendo utilizada como planta medicinal e aromática, além de ser conhecida por ser sudorífica e ter propriedades antipiréticas (redução da febre). A espécie tem sido considerada de grande potencial entre as principais gramíneas produtoras de óleos essenciais economicamente importantes, pois é uma potencial fonte natural de citral.

O citral é um composto de grande interesse econômico, pois é amplamente empregado na indústria de perfumaria, alimentos, cosméticos, aromatização de sorvetes, refrigerantes, entre outros. Uma pesquisa realizada na Europa revelou que o citral estava presente em 76% dos desodorantes, 41% de produtos domésticos e 33% das formulações cosméticas a base de ingredientes naturais. Apresenta forte odor cítrico, sendo utilizado, na indústria farmacêutica como matéria-prima para a síntese de iononas, como por exemplo, a β -ionona especificamente utilizada como substância de partida para a síntese de vitamina A.

Em função do potencial produtivo de *Elionurus muticus* e da necessidade de conhecimento, informações e pesquisas sobre a espécie, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar o sistema reprodutivo da espécie e realizar a caracterização botânica e agrônômica, com intuito de iniciar o melhoramento genético da espécie visando o aumento do teor de óleo essencial.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 *Elionurus muticus* (Spreng.) Kuntze

Elionurus muticus, conhecido popularmente como “capim-limão” ou “capim-carona”, pertence à família Poaceae. O gênero *Elionurus* compreende cerca de 15 espécies, normalmente encontradas em regiões de clima tropical e subtropical da América do Sul, África e Austrália (Hess *et al.*, 2007) e regiões temperadas na Ásia (Araújo, 1971; Renvoize, 1978; Watson & Dallwitz, 1994; Longhi-Wagner *et al.*, 2001). No Rio Grande do Sul, as espécies do gênero *Elionurus* estão entre as principais gramíneas presentes no bioma Pampa.

O gênero apresenta uma taxonomia complexa, com grande diversidade e ainda pouco esclarecida (Füller, 2013), além de apresentar dificuldade taxonômica relacionada a sinonímias. Renvoize (1978) em uma revisão sobre o gênero encontrou 16 sinonímias para *E. muticus*. Filgueiras (1995) citou *Andropogon adustus* Trin., *E. adustus* Trin. e *E. planifolius* Renvoize como sinonímias de *E. muticus* (Spreng.) Kuntze. Da mesma forma, Longui-Wagner (2001) englobou como sinonímia de *E. muticus* as espécies *E. rostratus* e *E. adustrus*.

As plantas de *E. muticus* são herbáceas, perenes e ocorrem naturalmente no estado do Rio Grande do Sul, apresentam atividade antioxidante devido ao conteúdo de seus compostos fenólicos, sendo utilizadas como plantas medicinais e aromáticas, além de também serem conhecidas pelo seu efeito sudorífico e pelas

propriedades antipiréticas (redução febre) (Boose & Holt, 1999; Muchuweti *et al.*, 2006).

A espécie atinge um metro de altura e cresce em solos arenosos pobres, com pH levemente ácido (Hess *et al.*, 2007), pode ser propagada por sementes, no entanto não existem informações na literatura sobre essa forma de propagação, ou assexuadamente, através da divisão de touceiras.

O capim limão tem despertado grande interesse econômico, devido à produção de óleo essencial proveniente da parte aérea. No óleo, o Citral é o composto que desperta maior interesse na espécie, pois é amplamente empregado nas indústrias de perfumarias, alimentos e cosméticos (Hess *et al.*, 2007), sendo relatado como um dos componentes principais da fração volátil de *E. muticus* (Chagonda *et al.*, 2000, Füller *et al.*, 2017). O que torna *E. muticus* uma excelente alternativa como fonte natural de citral, por ser uma espécie nativa do Brasil e adaptada ao meio ambiente (Füller *et al.*, 2014).

2.2 Caracterização morfológica e agrônômica

A caracterização de plantas é uma atividade essencial no manejo de coleções de germoplasma *ex situ*, e consiste em coletar dados para descrever, identificar e diferenciar genótipos de uma mesma espécie. Devido ao potencial econômico das espécies medicinais e aromáticas, os estudos que visam à caracterização e conservação de germoplasma dessas espécies vêm crescendo de forma expressiva (Souza, 2015).

A caracterização de germoplasma é importante para subsidiar a utilização dos recursos naturais, possibilitando que novos materiais de interesse sejam incluídos em programas de melhoramento genético, além de servir como base para

o delineamento de estratégias de conservação (Souza, 2015). Diferentes métodos são utilizados na caracterização de recursos genéticos, dentre eles estão avaliações de características morfológicas, agronômicas e moleculares.

A caracterização morfológica é uma ação de pré-melhoramento, em que dados obtidos juntamente com a produtividade e outras características de interesse agrônomo, como rendimento de óleo essencial, são reunidos, podendo auxiliar na escolha de genitores com as características favoráveis para o desenvolvimento de linhagens (Morais *et al.*, 2006). Na avaliação e caracterização são consideradas cinco etapas, como: a correta identificação botânica; elaboração e cadastro de acessos por espécie; caracterização; avaliação preliminar e avaliação complementar (Valls, 1988). Além disso, o conhecimento das características da espécie de interesse e do ambiente de cultivo contribuem para a seleção de genótipos mais adaptados a ambientes específicos (Camêlo *et al.*, 2011).

A caracterização morfológica e agrônoma busca descrever os diversos acessos de uma coleção de germoplasma utilizando como descritores características de interesse da espécie, tais como: a cor das folhas, presença ou ausência de odor nas folhas, nervuras foliares, caracterização botânica e morfológica, coloração e tamanho das inflorescências, início de floração, caracterização das sementes, sistema reprodutivo, formas de propagação, altura de planta, perfilhamento, comprimento e largura das lâminas foliares, relação comprimento/largura, produção de biomassa/planta, produção de plantas/Ha, produção, teor, rendimento e caracterização química do óleo essencial, entre outros.

Dentre os caracteres agrônomicos das espécies medicinais e aromáticas, os de maior importância são a produção de biomassa e rendimento de óleo essencial.

Esses caracteres estão diretamente relacionados ao ambiente em que o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo, os quais podem interferir na produção de biomassa e na composição química dos óleos essenciais (David *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2012). Além disso, a produção de biomassa e síntese de princípios ativos nas plantas medicinais e aromáticas dependem de outros fatores, como, o fator genético, condições edafoclimáticas, manejos culturais, intensidade luminosa, fotoperíodo e a temperatura, que podem influenciar diretamente na produção de princípios ativos, ou indiretamente, através do aumento de biomassa das plantas de espécies produtoras de óleos essenciais (Valmorbida *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2012).

Quando se pretende explorar economicamente uma determinada espécie vegetal, o ponto de partida deve ser o estudo das formas de propagação e se elas apresentam viabilidade para o estabelecimento de um sistema produtivo (Scheffer, 1992). Sendo assim, para viabilizar o cultivo racional de *E. muticus* é importante o estudo de métodos de propagação, como o perfilhamento, visando a caracterização da espécie. O perfilhamento é definido como o processo de produção de rebentos subterrâneos por uma única planta, denominados perfilhos e que são unidades básicas de crescimento em algumas espécies de Poaceae. Além do conhecimento da propagação vegetativa, é importante o conhecimento da propagação sexuada, representada pela germinação das sementes. Dentre os fatores que influenciam a germinação a luz e a temperatura, além da água, são de maior importância (Rosa & Ferreira, 2001; Ferreira & Rosa, 2009). O conhecimento das condições favoráveis de luz e temperatura, possibilita verificar se há ocorrência de germinação de maior ou menor número de sementes em uma amostra, bem como verificar a velocidade

da germinação (Heydecker, 1977; Mascia-Vieira *et al.*, 2007; Ferreira & Rosa, 2009), entre outras características.

A realização da caracterização em espécies medicinais e aromáticas é importante, pois viabiliza a caracterização dos recursos fitogenéticos, permitindo a seleção de acessos promissores para o cultivo que apresentem características superiores, principalmente em relação aos teores e rendimentos de óleo essencial (Blank *et al.*, 2004a). *E. muticus* é uma espécie que apresenta potencial medicinal, aromático e econômico, no entanto, os estudos ainda são escassos principalmente no que se refere à caracterização e identificação de descritores agrônômicos e morfológicos. A caracterização morfológica e agrônômica permitirá a seleção dos indivíduos mais promissores para o cultivo, especialmente aqueles com características superiores relacionadas à produção de biomassa e produtividade do óleo essencial e seus principais componentes, além de contribuir para a conservação da espécie.

2.3 Óleo essencial

Os óleos essenciais são produtos do metabólito secundário sintetizados, estocados e liberados através de estruturas epidérmicas, glândulas secretoras e tricomas, encontradas em folhas, raízes, caule, flores e frutos (Simões *et al.*, 2007). Também são denominados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, são misturas complexas, voláteis e normalmente, são líquidos de aparência oleosa, odoríferas, solúveis em solventes orgânicos e em água apresentam solubilidade limitada (Simões *et al.*, 1999). São utilizados para as mais diversas finalidades, devido as suas propriedades terapêuticas, aromáticas, microbianas, dentre outras.

A regulação da produção de óleo essencial em espécies aromáticas, assim como, a variabilidade no teor e composição do óleo estão condicionados a fatores ambientais que interagem com as características genéticas da planta (Castro *et al.*, 2004), à localização dos órgãos de armazenamento na planta (folhas, inflorescências, raízes e caules), condições climáticas, localização geográfica, características genéticas e ontogenia da espécie (Sangwan *et al.*, 2001). A grande variedade de compostos dos óleos essenciais merece melhor atenção, uma vez que através do melhoramento genético, é possível elevar determinado composto químico que seja de interesse pelas indústrias farmacêuticas, alimentícias, agroquímicos, de cosméticos e perfumaria (Sant'ana, 2009; Camêlo *et al.*, 2011).

Os métodos de extração para isolar os óleos variam conforme a localização do óleo volátil na planta e com a proposta de utilização do mesmo, porém, dependendo do método, a composição do óleo pode variar significativamente (Cassel *et al.*, 2009). No processo de extração de óleo essencial, podem ser aplicados diversos métodos, como a hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enfleuragem, gases supercríticos e microondas, dentre esses, o método de maior aplicação a nível laboratorial é o de hidrodestilação (Dawidowicz *et al.*, 2008). De acordo com Yusoff *et al.* (2011) a proporção de óleos essenciais extraídos por destilação a vapor é de 93%, enquanto que os 7% restantes são extraídos utilizando os outros métodos.

Devido à produção de óleos essenciais constituírem uma atividade econômica rentável, o cultivo de plantas aromáticas tem aumentado, pois há um interesse econômico relativo aos componentes aromáticos de plantas, direcionando a atenção à seleção de espécies comercialmente cultivadas, considerando quantidade e qualidade das substâncias voláteis (Paviani, 2004).

Os constituintes dos óleos essenciais variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos e peróxido, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros, em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços) (Simões & Spitzer, 2000). Dentre os inúmeros compostos existentes, é destacado o citral, o qual é um aldeído monoterpênico com forte odor de limão, formado por uma mistura dos isômeros geranial (transcitril) e neral (ciscitril), sendo separáveis por cromatografia gás líquido (Leal, 1998; Miranda, 2012). É um composto antiespasmódico e antimicrobiano e que desperta o maior interesse na espécie *E. muticus*, já que é um dos compostos majoritários da espécie, e é amplamente empregado nas indústrias de perfumarias, alimentos e cosméticos, para aromatização de sorvetes, bebidas, refrigerantes, confeitos, composição de perfumes, entre outros produtos (Koshima *et al.*, 2006).

2.4 Viabilidade das sementes

O nível da qualidade fisiológica de uma semente pode ser determinado através de dois parâmetros fundamentais, a viabilidade e o vigor (Santos & Paula, 2005). A viabilidade é medida principalmente pelo teste de germinação e procura determinar a máxima germinação de uma semente, sendo oferecidas condições favoráveis. E o vigor detecta atributos mais sutis da qualidade fisiológica, não revelados pelo teste de germinação (Zambiasi, 2015). O vigor das sementes é função de um conjunto de características que determinam o potencial para

emergência rápida e uniforme de plântulas normais, sob ampla diversidade de condições ambientais (Aosa, 2009; Guedes *et al.*, 2009).

A viabilidade pode ser avaliada em laboratório através de métodos, como teste de germinação e o teste de tetrazólio (Vassalo & Altisenti, 1991; Menezes *et al.*, 2004). Enquanto, que a primeira contagem do teste de germinação pode ser utilizada como um teste de vigor, uma vez que a velocidade de germinação é reduzida com o avanço da deterioração da semente (Nakagawa, 1999; Guedes *et al.*, 2009). O vigor também pode ser determinado através de avaliações do crescimento de plântulas, testes de frio, condutividade elétrica e envelhecimento acelerado (Aosa, 2009).

É crescente a importância de trabalhos que envolvam a obtenção de sementes de espécies medicinais e aromáticas, não domesticadas, principalmente em relação ao conhecimento dos parâmetros fisiológicos das sementes (Faron *et al.*, 2004; Dousseau *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2016). Entre os principais fatores que dificultam a introdução e domesticação de espécies medicinais, é destacado o poder germinativo das sementes, que pode ser influenciado diretamente por condições ambientais como temperatura e luminosidade (Rosa & Ferreira, 2001; Melo *et al.*, 2016). A temperatura exerce forte influência na velocidade, uniformidade de germinação e é relacionada com os processos bioquímicos; na qual as sementes apresentam comportamento variável em diferentes temperaturas, não havendo uma única recomendação para todas as espécies, pois esta é dependente das condições climáticas de suas regiões de origem, na época propícia para a germinação natural (Andrade *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2015).

O conhecimento dos parâmetros que envolvem a germinação de sementes de espécies medicinais e aromáticas, como *E. muticus*, é importante, pois serve

como caracterização da espécie e possibilita a propagação sexuada, visando o melhoramento genético, a conservação e a utilização sustentável das espécies medicinais e aromáticas.

2.5 Sistema de cruzamento

Para o planejamento e desenvolvimento de um programa de melhoramento genético, bem como, para compreensão do seu processo de domesticação, os aspectos da biologia da planta são de fundamental importância, pois auxiliam na definição ou adoção de técnicas mais apropriadas para o seu melhoramento genético (Allard, 1971).

O conhecimento do sistema de cruzamento, ou modo de reprodução, da espécie e as características de seus órgãos reprodutivos são importantes, pois apresentam grande efeito na colonização de diferentes habitats, na resposta às alterações ambientais (Karasawa, 2009) e são decisivos na escolha do método mais adequado para a condução de um programa de melhoramento. Além disso influencia a estrutura genética da população, a escolha do método de melhoramento, tipo de variedade/cultivar a ser obtido e a forma de conduzir os campos de produção de sementes.

Existem duas formas de reprodução, assexuada ou sexuada. As formas assexuadas compreendem todos os mecanismos que originam clones geneticamente idênticos à planta mãe, como: reprodução vegetativa e apomixia. Enquanto que as formas sexuadas apresentam diferentes sistemas de cruzamento: sistemas autógamos (plantas que se autofecundam), alógamos (plantas que apresentam fecundação cruzada) e mistos ou intermediários (plantas que se

autofecundam e que apresentam fertilização cruzada) (Fryxel, 1957; Karasawa, 2009).

A reprodução sexuada, no melhoramento de plantas, busca a variabilidade genética, que é explorada na tentativa de se selecionar genótipos superiores em detrimento dos inferiores. Já para fixação dos genótipos desejáveis, usa-se a reprodução assexuada, no intuito de evitar a perda dos caracteres desejados, caso a espécie for sexualmente propagada; portanto, ambos os sistemas reprodutivos têm sua devida importância para o melhoramento de plantas (Oliveira *et al.*, 1999).

A determinação do sistema de cruzamento, da maioria das espécies de gramíneas, é baseada nos resultados comparativos de formação de sementes em inflorescências protegidas, isoladas e de polinização aberta (Bogdan, 1959; Murawski & Hamrick, 1991; Silveria & Moraes, 1996; Lemes *et al.*, 2007). Também, pode ser determinada através de experimentos de polinização manual, avaliação de progênies e estimativas da estrutura genética (Paggi *et al.*, 2015), bem como, ser estimado através do uso de marcadores isoenzimáticos e genéticos moleculares, como RAPD e microssatélites (SSR) (Glaubitz & Moran, 2000; Collevatti *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2009; Chiari *et al.*, 2010; Soengas *et al.*, 2013).

2.6 Isoenzimas

Marcadores genéticos são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como as isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA, que corresponde a regiões expressas ou não do genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Faleiro, 2007), além de serem características do DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente.

As isoenzimas são formas diferentes de uma mesma enzima que apresentam afinidade por um mesmo substrato, ou seja, desempenham a mesma atividade catalítica, mas podem ter diferentes propriedades cinéticas e ser separadas por processos bioquímicos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Podem ser observadas na maior parte dos tecidos e são consideradas marcadores neutros de herança co-dominante (Souza, 2015), isto é, genótipos heterozigotos e homozigotos de um determinado locus são facilmente identificados, o que permite estimar parâmetros tais como frequências genotípicas e alélicas e a partir destes, coeficientes de diversidade gênica e heterozigosidade. Dispensam o conhecimento prévio sobre o genoma da espécie a ser estudada, permitem a análise rápida de grande número de amostras (Robinson, 2006) e os resultados podem ser obtidos a baixo custo, em relação aos demais marcadores (Faleiro, 2007). No entanto, apresentam limitações relacionadas a necessidade do conhecimento prévio dos sistemas enzimáticos mais discriminantes em cada espécie (Souza, 2015). Uma vez conhecidos, se torna relativamente simples e rápida (Martins *et al.*, 2007).

A técnica tem sido utilizada na caracterização de espécies (Ali *et al.*, 2012; 2013), investigações dos padrões de variabilidade e estrutura genética de populações naturais (Gois *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2010; Takrouni *et al.*, 2012) e dos sistemas de cruzamentos (Gusson *et al.*, 2006), além de ter sido importante no auxílio da identificação quimiotaxonômica de espécies medicinais e aromáticas (Lopes *et al.*, 2003), bem como em análises de correlação entre os perfis genético e químico dessas espécies (Ali *et al.*, 2013; Souza, 2015). Ainda que existam técnicas mais atuais utilizadas para determinar o sistema de cruzamento das espécies, muitas vezes sendo mais eficientes na obtenção de polimorfismo

genético, as isoenzimas ainda são empregadas em análises genéticas que não requeiram amostragem ampla do genoma (Souza, 2015).

A técnica de isoenzimas, apesar de ser uma técnica mais antiga, não pode ser esquecida, pois serve como uma importante ferramenta na determinação do sistema de cruzamento, entre outras caracterizações, de espécies vegetais que não apresentam o desenvolvimento de *primers* específicos (Faleiro, 2007) e nem estudo prévio do genoma (Zucchi, 2002; Melo, 2012), como é o caso de inúmeras espécies aromáticas e medicinais, como *E. muticus*. Além de ser uma técnica relativamente fácil de ser realizada, pode ser usada em praticamente qualquer espécie, e com um menor custo de execução, servindo como alternativa em situações em que os recursos financeiros para a pesquisa são escassos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Germoplasma

O germoplasma utilizado consta de uma população de *E. muticus* procedente do município de São Borja/RS com 104 indivíduos cultivados em vasos. Essa população já foi previamente estudada e caracterizada, com alguns resultados apresentados por Füller *et al.* (2014; 2015; 2017).

As plantas provenientes do município de São Borja/RS, foram coletadas durante os anos de 2010 e 2011; e exsicatas do material coletado foram montadas e catalogadas no Herbário ICN do Departamento de Botânica da UFRGS (Voucher=152281). Atualmente a população está sendo conduzida em casa de vegetação, nas dependências do Departamento Plantas de Lavoura, da Faculdade de Agronomia, UFRGS.

3.2 Métodos

3.2.1 Avaliação botânica e desenvolvimento das inflorescências

Para a avaliação botânica, inflorescências de *E. muticus* foram coletadas de plantas cultivadas em casa de vegetação. As inflorescências, em pré-antese e pós-antese, foram analisadas em estereomicroscópio de fluorescência Leica M165 FC nas dependências do Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de

Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Foram visualizadas e descritas as estruturas botânicas presentes nas inflorescências.

A avaliação dos estágios do florescimento foi realizado por um acompanhamento *in situ* do desenvolvimento das inflorescências das mesmas plantas, através de observações diárias, desde o início do surgimento das primeiras emissões florais até o início da dispersão das sementes.

Todas as avaliações, das fases do ciclo reprodutivo, foram realizadas através do método qualitativo. De acordo com d'Eça-Neves & Morellato (2004), as fases fenológicas podem ser avaliadas por dois métodos, qualitativos e quantitativos, os quais podem ser reagrupados em métodos diretos e indiretos. No caso do método direto qualitativo é aplicado uma escala nominal, que consiste na presença ou ausência da fenofase, sem uma preocupação com a quantificação de cada fenofase. Os métodos de avaliação direto qualitativos podem ser facilmente aplicados em qualquer tipo de vegetação; não dependem de treinamento para aplicação; permitem avaliar a sincronia entre indivíduos; são de baixo custo, com esforço amostral e tempo de observação baixos; no entanto, não permitem avaliar a intensidade das fenofases (d'Eça-Neves & Morellato, 2004).

Foram quantificadas as inflorescências coletadas e as sementes produzidas durante o período. As sementes foram trilhadas manualmente, sendo separadas da espiguetas uma a uma, devido a fragilidade.

3.2.2 Caracterização e viabilidade das sementes

Foram utilizadas sementes de *E. muticus*, coletadas de plantas cultivadas em casa de vegetação e os experimentos foram conduzidos nos laboratórios do Departamento Plantas de Lavouras e do Departamento Plantas Forrageiras e

Agrometeorologia, da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

As medidas biométricas das sementes foram realizadas em quatro repetições de 25 sementes/cada, utilizando paquímetro digital. Foi considerado como comprimento a medida entre a base e o ápice da semente e largura, a medida em contraposição ao comprimento. Os mesmos conjuntos de sementes foram utilizados para avaliar o peso de 25 sementes.

O teste de germinação foi realizado em delineamento completamente casualizado com quatro repetições de 25 sementes/cada. Foram testadas seis temperaturas constantes (5, 10, 15, 20, 25 e 30°C) em fotoperíodo de 12 horas, uma temperatura alternada (20/30°C) em fotoperíodo de 16 horas sem luz na menor temperatura e 8 horas com luz na maior temperatura, e duas condições de luminosidade (escuro constante e luz/escuro alternado 12 horas) em temperatura constante de 25°C, todos os experimentos foram realizados em câmara tipo BOD®, de acordo com a Regras de Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Previamente as sementes, utilizadas em cada tratamento/repetição, foram submersas em hipoclorito 2% por 1 minuto e 30 segundos, para a desinfecção de possíveis patógenos, e logo após lavadas com água destilada. A semeadura foi realizada em placas de petri, revestidas com 3 folhas de papel germinador e embebidos com 5 mL de água destilada. Logo após a montagem as placas de petri foram colocadas para germinação em câmara tipo BOD®, nas temperaturas já citadas. Para a análise do fotoblastismo negativo, efeito da luminosidade, cada placa de petri foi embalada em duas folhas de papel alumínio, garantindo a não incidência de luz no interior, e as avaliações foram realizadas no escuro com auxílio de luz verde de segurança (Kendricks & Frankland, 1983; Amaro *et al.*, 2006).

Após 24 horas da instalação foram iniciadas as observações, o número de sementes germinadas foi avaliado todos os dias e foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentaram protrusão da radícula, com no mínimo 2mm, sendo a duração do teste de 15 dias. Foram avaliados o tempo inicial de germinação (Ti), porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG), frequência relativa de germinação (Fr%), número de plântulas normais (PN) e anormais (PA), número de sementes duras (SD) e murchas (SM). E após o período de 15 dias foram avaliados o comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR) e comprimento total (CP) das plântulas. As variáveis foram calculadas da seguinte forma:

- Porcentagem de germinação (Labouriau & Valadares, 1976):

$$G = \left(\frac{N}{A} \right) \cdot 100$$

Onde: G= porcentagem de germinação; N= número de sementes germinadas; A= número total de sementes colocadas para germinar.

- Índice de velocidade de germinação: calculado pelo somatório do número de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a germinação (Maguire, 1962).

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \frac{G_3}{N_3} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$

Onde: IVG= índice de velocidade de germinação; G1, G2, G3, ..., Gn= número de plântulas computadas na primeira, segunda, terceira e última contagem; N1, N2, N3, ..., Nn= número de dias da semeadura à primeira, segunda, terceira e última contagem.

- Tempo médio de germinação: obtido através das contagens diárias das sementes germinadas até o 15º dia após a semeadura, calculado através da fórmula abaixo e os resultados expressos em dias (Labouriau, 1983).

$$TMG = \frac{\sum ni \cdot ti}{\sum ni}$$

Onde: TMG= tempo médio de germinação (dias); ni= número de sementes germinadas no intervalo entre cada contagem; ti= tempo decorrido entre o início da germinação e a i-ésima contagem.

- Velocidade média de germinação (Labouriau & Valadares, 1976):

$$VMG = \frac{1}{t}$$

Onde: VMG=velocidade média de germinação; t= tempo médio de germinação.

- Frequência relativa de germinação (Labouriau & Valadares, 1976):

$$Fr = \frac{ni}{\sum_{i=1}^k ni}$$

Onde: Fr= frequência relativa de germinação (%); ni= número de sementes germinadas por dia; $\sum ni$ = número total de sementes germinadas.

Para avaliação das plântulas, foram consideradas plântulas normais aquelas que apresentaram todas as suas estruturas bem desenvolvidas, proporcionais e saudáveis, ou com pequenos defeitos que não interferiam no seu desenvolvimento. Para plântulas anormais foram consideradas aquelas com qualquer uma de suas estruturas ausentes ou danificadas, ou que apresentavam alguma deformidade ou deterioração. Sementes duras aquelas que permaneceram até o final do teste com aspecto de sementes recém colocadas no substrato e sementes murchas, aquelas

que no final do teste não germinaram e se apresentaram amolecidas, atacadas por microorganismos e que não apresentaram nenhum sinal de início de germinação (Brasil, 2009).

No final dos testes de germinação as plântulas normais de cada repetição foram avaliadas quanto ao seu desenvolvimento, com auxílio de uma régua graduada (cm) foi medido comprimento da parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR) e comprimento de plântula (CP).

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram submetidas ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico R (R Core Team, 2016).

3.2.3 Determinação do sistema de cruzamento de *E. muticus*

3.2.3.1 Determinação do protocolo isoenzimático para a espécie *E. muticus*

3.2.3.1.1 Coleta de material

Para identificar os sistemas enzimáticos mais adequados ao estudo genético de *E. muticus* foram testadas a utilização de folhas em diferentes estágios de desenvolvimento e em diferentes tempos de armazenamento.

Foram utilizadas folhas de matrizes, estágio adulto: 1) frescas (recém coletadas) e mantidas refrigeradas, por um período de 24 horas até a realização das análises; e 2) congeladas em nitrogênio líquido e posterior armazenamento em congelador (-18°C) por um período de 6 meses. E folhas de progênes, estágio de plântula: 1) frescas (recém coletadas) e mantidas refrigeradas, por um período de 24 horas até a realização das análises; e 2) refrigeradas (5°C) por período de 7 dias.

O material fresco foi coletado no período da manhã, de acordo com o Manual de eletroforese de isoenzimas (Montagna *et al.*, 2013), e armazenado em tubos eppendorf®, evitando a desidratação do material vegetal. Os tubos foram transferidos para sacola térmica contendo gelo e levados para o município de Florianópolis/SC. Após o traslado as amostras foram transferidas para a geladeira até o momento da realização das análises, as quais foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.2.3.1.2 Extração das enzimas

A extração, tanto para matrizes quanto para progênies, foi realizada através da maceração automática do material vegetal, no aparelho Precellys® 24, com o emprego da solução de extração nº 1 (Alfenas *et al.*, 1991). Em cada tubo de maceração (modelo Hard tissue grinding MK28), foram adicionados: aproximadamente 50 mg de material foliar, 4 esferas de aço inoxidável, 0,4 ml de solução de extração nº 1 (Alfenas, 1998) e cerca de 10 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Os tubos foram agitados por 17" a 6000 RPM. O líquido resultante do processo de maceração foi absorvido em tiras de papel cromatográfico (Whatman nº 3), com 2 X 20 mm de tamanho, denominados wicks. Posteriormente os wicks foram dispostos lado a lado no gel de amido (penetrose 30 a 13%), para posterior corrida eletroforética. Cada gel comportava 48 amostras e o monitoramento da corrida foi feito usando wicks embebidos em solução de azul de bromofenol 1 %.

3.2.3.1.3 Eletroforese

Foram testados o total de 23 sistemas enzimáticos (Tabela 1). Em um primeiro momento foram testados 18 sistemas para identificar os mais adequados ao estudo de *E. muticus*. A separação dos produtos proteicos foi realizada a partir

de eletroforese horizontal, tendo como meio suporte de penetrose (13%) e tampão de corrida Tris-Citrato (TC). Em um segundo momento foram selecionados os sistemas que apresentaram melhor desempenho na primeira corrida e que necessitavam algum ajuste para a obtenção de bons resultados, além de cinco sistemas enzimáticos que não foram utilizados no primeiro teste. Foram testados nove sistemas enzimáticos em tampão de corrida TC (GDH, IDH, NADH, PRX, SDH, SKDH, SOD, α -EST e β -EST) e nove sistemas em tampão de corrida Citrato de morfolina (CM) (GDH, G6PDH, ACP, DDH, SDH, SKDH, SOD, ME, e β -EST).

TABELA 1. Sistemas enzimáticos testados em *Elionurus muticus*. Porto Alegre/RS. 2017.

Enzima	Sigla	E.C.
Álcool desidrogenase	ADH	1.1.1.1
Alfa-esterase	α -EST	3.1.1.1
Beta-esterase	β - EST	3.1.1.2
D-desidrogenase	DDH	1.4.1.16
Diaforase	DIA	1.8.1.4
Enzima málica	ME	1.1.1.40
Fosfatase ácida	ACP	3.1.3.2
Fosfogluco isomerase	PGI	5.3.1.9
Fosfoglucomutase	PGM	5.3.1.9
Fosfogluconato desidrogenase	6PGDH	1.1.1.44
Glicerato-2 desidrogenase	G2DH	1.1.1.29
Glucose desidrogenase:	GDH	1.4.1.3
Glucose-6-fosfato desidrogenase	G6PDH	1.1.1.49
Glutamato desidrogenase	GIDH	1.4.1.3
Glutamato oxalacetato transaminase	GOT	2.6.1.1
Isocitrato desidrogenase	IDH	1.1.1.42
Leucima aminopeptidase	LAP	3.4.11.1
Malato desidrogenase	MDH	1.1.1.37
Nicotinamida adenina dinucleotídeo	NADHDH	1.6.99.3
Peroxidase	PRX	1.11.1.7
Sorbitol desidrogenase:	SDH	1.1.1.14
Superóxido dismutase	SOD	1.15.1.1
Xiquimato desidrogenase	SKDH	1.1.1.25

E.C.= Enzyme Code

As condições de corrida variaram conforme o sistema gel/eletrodo empregado (Tabela 2). Ao término da corrida eletroforética, o gel foi fatiado e as camadas retiradas, uma a uma, e acomodadas uma em cada cuba onde foram

reveladas. A corrida foi realizada em refrigerador para preservar a atividade enzimática.

TABELA 2. Sistemas tampão gel/eletrodo e condições de corrida, empregados no estabelecimento de protocolo de isoenzimas para *Elionurus muticus*. Porto Alegre/RS. 2017.

Sistema	Tampão do eletrodo	Tampão do gel	Condições de corrida		
			Tempo de corrida (min)		
			20	20-40	40-250
Tris-citrato (TC)	Tris 27g.L ⁻¹ Ácido cítrico 16,52 g.L ⁻¹ Titular com NaOH até pH 7,5	Diluição a 3,5% do tampão eletrodo	100V	140V	180V
Citrato de Morfolina (CM)	Ácido cítrico 7,68 g.L ⁻¹ Titular com N-(3-aminopropil) morfolina até pH 6,1	Diluição a 5% do tampão eletrodo	100V	160V	220V

3.2.3.1.4 Revelação dos sistemas enzimáticos

As soluções de revelação foram preparadas de acordo com o sistema enzimático empregado. Para a maioria das enzimas o processo foi realizado em estufa (37° C) e no escuro. Com exceção da enzima Superóxido dismutase (SOD), que foi revelada sob luz branca e em temperatura ambiente.

O tempo de revelação variou para cada sistema enzimático, sendo que a maioria das enzimas foram reveladas entre 20 e 30 minutos, entretanto algumas levaram mais de 12 horas. Após revelação, com auxílio de um pipetador, a solução foi sugada e o gel lavado com água destilada, interrompendo o processo de revelação.

3.2.3.1.5 Avaliação dos zimogramas

Os resultados obtidos na revelação dos sistemas enzimáticos foram avaliados segundo a sua resolução, adotando os seguintes critérios: resolução

muito boa (MB), resolução regular (B), resolução ruim (R), sem atividade (s.a.) e não realizado (n.r.).

A interpretação dos zimogramas seguiu padrões descritos por Alfenas (1998). As zonas codificadoras foram identificadas a partir da sua migração; a mais rápida (catódica) foi denominada de zona um e a de migração mais lenta (anódica) como dois, e a mesma identificação foi empregada para os alelos.

3.2.3.2 Determinação do sistema de cruzamento de *Elionurus muticus* através de isoenzimas

3.2.3.2.1 Material e amostragem

Foram selecionadas, aleatoriamente, da população cultivada em casa de vegetação 18 indivíduos que mais produziram sementes, denominadas matrizes. As matrizes selecionadas foram: SB 8, SB 15 clone, SB 31 clone, SB 41, SB 45 clone, SB 46 clone, SB 49, SB 51, SB 53, SB 56, SB 62, SB 63, SB 67, SB 73, SB 81, SB 85, SB 88, SB 93.

As sementes foram coletadas de cada matriz, devidamente identificadas, mantendo o controle para não haver mistura e colocadas para germinar em placas de petri com papel germinador embebido em água e mantidas em sala de crescimento climatizada, 23°C e fotoperíodo de 12 horas, por um período de 30 dias. Após, foi realizada a coleta das plântulas (progênies) e folhas frescas das matrizes, para análise isoenzimática, de acordo com o protocolo estabelecido anteriormente, no item 3.2.3.1. Para realizar a determinação do sistema de cruzamento foram utilizadas 18 matrizes com 12 a 15 progênies/cada.

3.2.3.2.2 Extração das enzimas e eletroforese

A extração das enzimas e a condução da eletroforese seguiram metodologia descrita nos itens 3.2.3.2. a 3.2.3.5. Foram utilizadas as seguintes enzimas: PGI, PGM, PRX, MDH, 6PGDH no tampão TC; ME e β EST no tampão CM. Totalizando 8 locos gênicos analisados: PRX, PGI, MDH, 6PGDH, PGM-1, PGM-2, ME e β EST.

3.2.3.2.3 Análise do sistema de cruzamento

O sistema de cruzamento foi analisado com base no modelo de cruzamento misto de Ritland & Jain (1981) e cruzamentos correlacionados (Ritland, 1989), implementados no *software* Multilocos MLTR versão 3.2 (Ritland, 2008).

O modelo de cruzamento misto assume que as progênies resultam de uma mistura de autofecundação e cruzamento. O modelo de cruzamentos correlacionados assume que a parte oriunda de cruzamentos foi gerada tanto por cruzamentos aleatórios quanto por biparentais.

As pressuposições do modelo misto são: 1) o conjunto de pólen é homogêneo para o cruzamento de todos os genótipos maternos; 2) a fecundidade é uniforme entre as plantas (todas as plantas têm igual capacidade de gerar descendentes); 3) os alelos de diferentes locos segregam independentemente (equilíbrio de ligação); 4) os locos avaliados não sofrem seleção ou mutação entre o período de fertilização e análise dos indivíduos (Ritland & Jain, 1981).

Foram estimados os parâmetros de taxa de cruzamento multiloco (t_m), taxa de cruzamento uniloco (t_s) e taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados ($t_m - t_s$), proporção de autofecundação ($s=1-t_m$), correlação de autofecundação (r_s), correlação multiloco de paternidade ($r_p(m)$), correlação uniloco de paternidade ($r_p(s)$), de onde deriva a proporção de irmão-completos (r_p) e meio-irmãos ($1 - r_p$), número médio de indivíduos polinizadores efetivos por plantas (N_{ep}) e coeficiente

de endogamia materno ($F(m)$). O erro padrão das estimativas foi calculado por 1.000 permutações (bootstraps). O coeficiente médio de endogamia das progênes foi obtido através da relação $F(p) = (1-tm)/(1+tm)$, sendo comparado ao $F(m)$ das matrizes.

Foram estimados os dados de diversidade genética para os locos utilizados e para as famílias, tais como: número de alelos por locos, porcentagem de loci polimórficos, heterozigosidade esperada e observada e índice de fixação obtidos com o auxílio do programa GENEPOP versão 4.2 (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008). As frequências alélicas e a distribuição da diversidade genética foram estimados utilizando os programas FSTAT (Goudet, 2002) e CERVUS 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007).

3.2.3.3 Determinação do sistema de cruzamento através do isolamento de inflorescências

Para a determinação do sistema de cruzamento, plantas da população de *E. muticus* tiveram pelo menos um ramo florífero isolado, no qual a inflorescência se encontrava em pré-antese. Os ramos de cada planta foram protegidos com saco de papel e tutorados com hastes de alumínio, para não ocorrer quebra do colmo florífero. Após 30 dias de ensacamento, as inflorescências que se mantiveram ensacadas foram coletadas, no total foram 17 inflorescências isoladas, e o número de sementes contado (adaptado de Schocken, 2007). Durante o mesmo período, o mesmo número de inflorescências livres, das mesmas plantas, foi coletado e o número de sementes contado.

O sistema de cruzamento preferencial foi determinado pelo desenvolvimento ou não desenvolvimento de sementes, considerando o sistema de cruzamento

autógamo a ocorrência do desenvolvimento de sementes e alógamo o não desenvolvimento (Pinto, 2009).

3.2.4 Avaliação da propagação vegetativa: perfilhamento

O experimento foi realizado no Departamento de Plantas de Lavoura, na casa de vegetação climatizada do PLAV, da Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. Foram selecionados 4 clones de indivíduos de *E. muticus*, provenientes da população de estudo. As plantas selecionadas apresentavam bom aspecto fitossanitário e seus perfilhos foram separados, misturados e distribuídos aleatoriamente para cada tratamento. Os tratamentos foram de um perfilho (T1), dois perfilhos (T2) e três perfilhos (T3). Para o transplante foram utilizados copos plástico de 500 mL, com substrato comercial e solo na proporção 1:1.

Antes da realização do transplante os perfilhos foram submetidos a uma limpeza, sendo feito o corte da parte aérea a um comprimento de cerca de 15 cm e a realização de toaletes das raízes. Os perfilhos foram transplantados para copos plásticos contendo o substrato e mantidos em casa de vegetação climatizada, com irrigação periódica durante 160 dias de cultivo, até o momento das avaliações. Durante o período as plantas não foram adubadas. O delineamento foi inteiramente casualizado, com oito repetições de cinco plantas por repetição. Foi avaliado a porcentagem de pegamento, altura das plantas e biomassa fresca foliar.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram submetidas ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico R (R Core Team, 2016).

3.2.5 Avaliação da relação biomassa, peso de biomassa e tempo de extração do óleo essencial

Com o objetivo de otimizar as extrações de óleo essencial de *E. muticus* e verificar a quantidade de biomassa vegetal mínima e tempo de extração que são necessários para a obtenção de óleo essencial, foi realizado um experimento que avaliou a relação do tipo de biomassa (fresca ou seca), quantidade de biomassa e tempo de extração.

O experimento determinou o volume, teor e rendimento de óleo essencial a partir da extração em Clevenger modificado, em seis níveis de peso de biomassa fresca e seca da parte aérea (5, 10, 25, 50, 75 e 100g de folhas) e seis tempos de extração (30, 60, 90, 120, 150, 180 minutos). O óleo essencial foi extraído em balão de 1 L com 500 mL de água destilada cobrindo as folhas. A cada 30 minutos de extração foi verificado o volume de óleo extraído, através da escala volumétrica do aparelho, para determinar o tempo ideal de extração em que atinge a estabilização do volume extraído. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, trifatorial, com três blocos/repetições, onde cada aparelho de Clevenger foi considerado um bloco.

O teor de óleo essencial foi calculado de acordo com o tipo de biomassa, considerando a biomassa fresca (base úmida-BU) e biomassa seca (base livre de umidade-BLU) (Santos *et al.*, 2004) utilizando as seguintes fórmulas:

BU=Base Úmida

$$To = \frac{Vo}{Bm} \times 100$$

Onde: T_o = teor de óleo (mL de óleo essencial em 100g de biomassa úmida); V_o = volume de óleo lido na escala do hidroddestilador; B_m = biomassa vegetal.

BLU= Base Livre de umidade

$$T_o = \frac{V_o}{B_m - \frac{B_m \times U}{100}} \times 100$$

Onde: T_o = teor de óleo (mL de óleo essencial em 100g de biomassa seca); V_o = volume de óleo extraído lido na escala do hidroddestilador; B_m = biomassa vegetal medida em gramas; $\frac{B_m \times U}{100}$ = quantidade de umidade presente na amostra;

$B_m - \frac{B_m \times U}{100}$ = quantidade de biomassa seca;

$U\% = \frac{\text{Massa úmida} - \text{Massa seca}}{\text{Massa úmida}} \times 100$ = determinação de umidade;

O rendimento de óleo essencial foi obtido a partir da multiplicação entre o teor de óleo e a biomassa fresca ou seca da parte aérea.

$$R_o = T_o \times B_m$$

Onde: R_o = rendimento de óleo essencial produzido; T_o = teor de óleo essencial; B_m = biomassa fresca ou seca.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram submetidas ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade com auxílio do programa estatístico R (R Core Team, 2016).

3.2.6 Caracterização fenotípica dos indivíduos da população

Indivíduos da população *E. muticus* foram avaliados com o interesse de futuramente selecionar indivíduos superiores, principalmente em relação a

produção de biomassa, e posteriormente em relação ao rendimento de óleo conforme potencial determinado em trabalhos anteriores (Füller *et al.*, 2010).

Cada indivíduo foi constituído por uma touceira previamente coletada no município de São Borja, como descrito no item 3.1. Os indivíduos são cultivados em vasos de cinco litros contendo substrato e mantidos em casa de vegetação, com irrigação periódica. Após cada corte, foi realizada adubação com Krystalon™ laranja (06-12-36). O delineamento experimental foi considerado o completamente casualizado, e cada indivíduo foi considerado uma unidade experimental, totalizando 53 indivíduos para o período para corte de 75 dias e 104 para o período para corte de 150 dias.

Antes do início das avaliações as plantas foram uniformizadas para o mesmo estágio de desenvolvimento, com um corte da parte aérea a 10 centímetros do solo, a partir do ponto de crescimento. As avaliações foram realizadas em dois períodos de crescimento, aos 75 e 150 dias após o primeiro corte, e cada período foi realizado em três repetições. As variáveis analisadas em cada indivíduo da população foram a presença ou ausência de odor cítrico, atribuindo os valores 0=sem odor perceptível e 1=com odor perceptível, altura de planta (cm) e peso de biomassa fresca total da parte aérea (g), durante o estágio vegetativo das plantas.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram submetidas ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade com auxílio do programa estatístico R (R Core Team, 2016).

3.2.7 Extração do óleo essencial

A partir dos resultados obtidos pela avaliação individual, foram selecionados 11 indivíduos, correspondendo a 10% da população, que

apresentaram maior produção de biomassa da parte aérea no período para corte de 150 dias em três repetições, para realizar a extração de óleo essencial e avaliar o volume, teor e rendimento do óleo essencial. Os indivíduos selecionados foram: SB 6, SB 7, SB 10, SB 13, SB 14, SB 45 clone, SB 55, SB 56, SB 73, SB 77 e SB 85. O material coletado foi armazenado em refrigeração à temperatura de -18°C até o momento da extração do óleo essencial, com o objetivo de manter as propriedades do material.

O material para a realização da extração do óleo essencial de *E. muticus* foi padronizado em amostras de 30g de biomassa fresca da parte aérea. As amostras foram submetidas a extração do óleo essencial por hidrodestilação em Clevenger modificado, durante 3 horas em balão de 1 litro com 500 mL de água destilada, e as extrações foram realizadas em triplicata. O volume de óleo foi medido pela graduação no aparelho Clevenger, enquanto que o teor e rendimento do óleo essencial seguiu o cálculo de BU (base úmida) do item 3.2.5.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram submetidas ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade e realizada análise de correlação entre as variáveis observadas, com auxílio do programa estatístico R (R Core Team, 2016).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação botânica

O objetivo principal da realização de estudos botânicos é a identificação correta de uma espécie vegetal, através da análise de características anatômicas e morfológicas, destacando as características peculiares de uma espécie. No caso de *E. muticus* não há informações suficientes na literatura que caracterizem de forma adequada a espécie, apresentando divergências tanto para o gênero *Elionurus*, quanto para a espécie *E. muticus* (Rosengurtt *et al.*, 1970; Renvoize, 1978; Longhi-Wagner *et al.*, 2001; Welker & Longhi-Wagner, 2007; Longhi-Wagner & Welker, 2012; Rocha *et al.*, 2014).

As inflorescências de *E. muticus* são racemos, que de acordo com caracterizações botânicas prévias e chaves taxômicas (Longhi-Wagner *et al.*, 2001; Welker & Longhi-Wagner, 2007; Longhi-Wagner & Welker, 2012) geralmente são representados por apenas um ramo no ápice do colmo florífero (Figura 1.a), como descrito para o gênero *Elionurus* por Longhi-Wagner *et al.* (2001). No entanto, foi possível visualizar na população São Borja a ocorrência do surgimento de inflorescências secundárias intermediárias no colmo florífero (Figura 1.b). O comprimento do colmo pode variar podendo chegar a 100 cm de comprimento (Figura 1.b), enquanto que a inflorescência pode ter entre 8 a 14 cm. Tanto as

inflorescências principais quanto as secundárias apresentaram formação de sementes.

Ao longo da inflorescência foi possível visualizar pilosidades de coloração esbranquiçada (Figura 1.c). Caracteres como a pilosidade, do ramo e da inflorescência, bem como a presença de tricomas brancos; folhas e/ou inflorescências com odor cítrico são características apresentadas nas chaves dicotômicas para identificação do gênero *Elionurus* (Longhi-Wagner *et al.*, 2001).

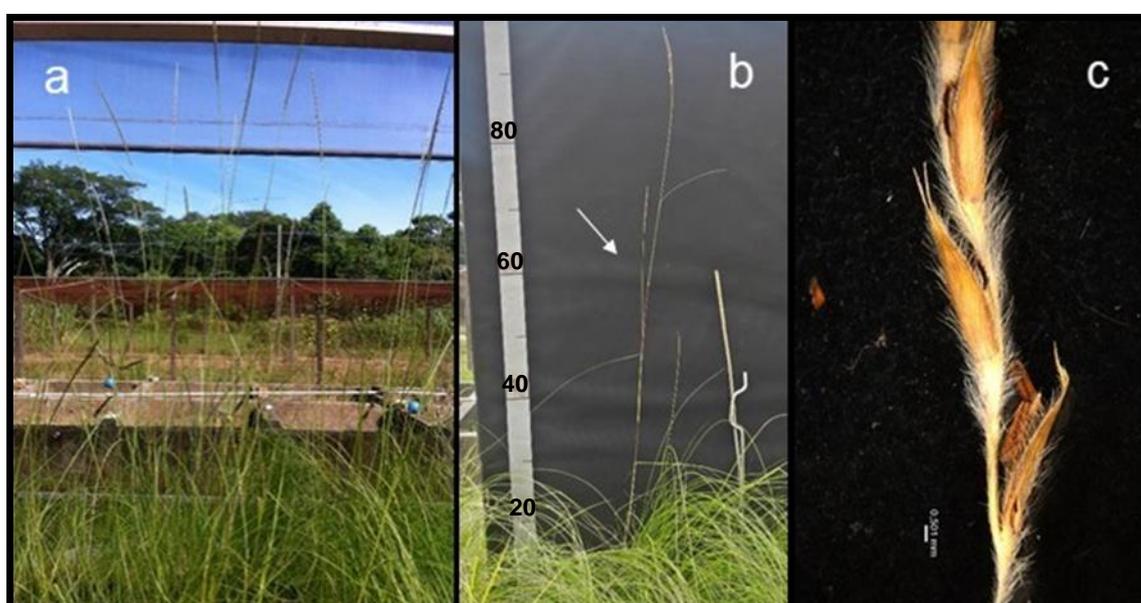


FIGURA 1. Inflorescências de *Elionurus muticus*: a) inflorescências no ápice do colmo florífero; b) seta indica inflorescência secundária intermediária no colmo florífero; c) inflorescência pilosa. Porto Alegre/RS. 2017.

As inflorescências são formadas por espiguetas alternadas sésseis, isto é, não apresentam haste de suporte, e pediceladas e seu tamanho pode variar de 4 a 7 mm. Através das análises no estereomicroscópio foi possível visualizar nas flores a presença de lema com aristas (Figura 2.a), pálea, lodículas (Figura 2.b) e gluma. Pálea é uma bráctea situada oposta ao lema, envolvendo a flor, e pode ser presente ou ausente em Poaceae, lodículas são escamas pequenas, inseridas na

base da flor, na axila do lema, enquanto que glumas, são brácteas estéreis que se situam na base da espiguetas (Longhi-Wagner *et al.*, 2001). Alguns autores, como Renvoize (1978) e Longhi-Wagner *et al.* (2001), relataram a ausência de pálea nas espécies do gênero *Elionurus*, o que não foi observado nas inflorescências analisadas. Essa divergência indica a necessidade de uma revisão taxonômica para o gênero, pois há ocorrência de descrições contraditórias, devido à grande variabilidade morfológica, necessitando de um maior cuidado na hora de interpretar as morfologias (Longhi-Wagner & Welker, 2012).



FIGURA 2. Espiguetas com flores completas de *Elionurus muticus*: a) seta indica aristas; b) seta indica lodícula; c) seta indica estigma plumoso; d) 1- estigmas plumosos; 2- lema e aristas; 3- pálea; 4- anteras. Porto Alegre/RS. 2017.

Rosengurtt *et al.* (1970) separaram as espécies de *Elionurus* de acordo com a presença ou ausência de odor cítrico, onde espécies de *E. rostratus*

apresentariam odor cítrico acentuado e em *E. candidus* seria ausente, no entanto, essa característica não é muito confiável, pois em determinadas condições edafoclimáticas o odor cítrico pode não ser liberado possibilitando erros na identificação das espécies de *Elionurus*. Em contrapartida, Renvoize (1978) e Zuloaga *et al.* (2003) consideraram estas duas espécies como sinônimos de *E. muticus* (Welker & Longhi-Wagner, 2007). Rocha *et al.* (2014) realizaram um levantamento florístico das Poaceae nas savanas costeiras amazônicas e criaram uma chave de identificação para as espécies de Poaceae de ocorrência. Ao criar a chave de identificação das espécies da região foi apresentado como principal identificação da espécie *E. muticus* o odor cítrico nas folhas e inflorescências.

Foi observado nas inflorescências a alternância entre flores completas, flores incompletas e flores estéreis, além disso as flores apresentaram três anteras, três estames e um gineceu com dois estigmas plumosos (Figura 2.c). Watson & Dallwitz (1994) relataram para o gênero *Elionurus* inflorescências com espiguetas curtas hermafroditas e espiguetas longas masculinas; flores incompletas próximas as flores femininas férteis (flor completa); ráquila terminada por uma flor feminina fértil; e presença de lodículas (2), estames (3) e estigmas (2) pigmentados. Rosengurt *et al.* (1970) e Smith *et al.* (1982) descreveram o gênero como tendo espiguetas pedicelada com flor masculina, enquanto Judziewicz (1991) e Filgueiras (1995) descreveram como neutra (sem estames e pistilos) ou masculina para o gênero e para *E. muticus* apenas espiguetas neutras, no entanto, no material do estado de São Paulo foi observado as duas possibilidades para a espécie (Longhi Wagner *et al.*, 2001), reforçando a necessidade de um maior aprofundamento do conhecimento botânico e taxonômico do gênero *Elionurus* e suas espécies, em especial para *E. muticus*.

4.2 Desenvolvimento das inflorescências

Uma das ferramentas básicas para o conhecimento biológico e ecológico de ecossistemas ou espécies são os estudos fenológicos. A fenologia floral é o estudo de uma das fases ou atividades do ciclo de vida das plantas e de sua ocorrência temporal, ao longo do ano (Morellato & Leitão, 1995; Acra *et al.*, 2012).

Nos três primeiros anos deste trabalho as plantas de *E. muticus* não apresentaram um florescimento expressivo, o que pode estar relacionado com estado nutricional dessas plantas, pois, ficaram sem tratamentos culturais, adubação e cuidados por um longo período. Além disso, a ocorrência do período de florescimento não foi compatível com o período citado em trabalhos com a espécie, que foi relatado como sendo entre outubro e novembro para a região sul (Füller, 2013).

No início de janeiro de 2017 os indivíduos de *E. muticus* foram podados para a avaliação de produção de biomassa e o início da emissão de inflorescências ocorreu entre o dia 8 a 10 de fevereiro, aproximadamente 30 dias após o corte dos indivíduos. O florescimento expressivo da população teve uma duração de aproximadamente 30 dias, durante esse período aproximadamente 93% da população apresentou florescimento possibilitando a observação das fases do florescimento de *E. muticus*, população São Borja, mantidas em casa de vegetação.

A partir do início da emissão do primórdio da inflorescência (Figura 3. a) foi possível observar que o ciclo reprodutivo, que abrange as fases de florescimento, antese, polinização, formação de frutos/sementes e dispersão, tem duração que pode variar entre 15 a 30 dias. O desenvolvimento da inflorescência pode variar, de 3 a 5 dias (Figura 3.b-d) e após esse período se dá início a antese (Figura 3.e). A antese é o período em que ocorre a abertura da flor, sendo que em *E. muticus*

acontece de forma gradual ao longo da inflorescência (Figura 3.f), em geral iniciando no ápice e sendo completa em 2 a 4 dias.

Durante o período não foi representativo a incidência de insetos ou outras formas de polinização, como pássaros e borboletas, na população, já que havia livre acesso ao interior da casa de vegetação. Com isso é possível presumir que a forma de polinização principal da espécie seja anemófila, pois a população se localizava próximo às laterais da casa de vegetação, onde o fluxo de ar era elevado, devido as laterais serem mantidas abertas durante o período. As espécies anemófilas, em geral, apresentam características que permitem a maior eficácia do vento como agente transportador de pólen, como flores reduzidas e agrupadas em inflorescências, filetes dos estames longos e pendentes, mantidos longe das partes vegetativas, o que aumenta a aerodinâmica, grãos de pólen relativamente pequenos (entre 17 e 58 μm) e pulverulentos, estigmas plumosos e com ampla superfície e pequeno número de óvulos (Culley *et al.*, 2002; Friedman & Barret, 2009; Rech *et al.*, 2014).

Em geral, as espécies da família Poaceae têm a anemofilia como meio de transportar seus grãos de pólen, com exceção de algumas poucas espécies florestais, principalmente da subfamília Bambusoideae, que são entomófilas (Boldrini *et al.* 2008; Schmidt & Longhi-Wagner 2009; Dórea 2011). As evidências baseadas em pólen fóssil indicam o surgimento das gramíneas (Poaceae) entre 65 e 55 milhões de anos, e o mais antigo registro de macrofóssil (planta inteira com inflorescência) data de 55 milhões de anos, de depósitos na Inglaterra e nos Estados Unidos (Willis & McElwain 2002), sendo as mais antigas evidências de gramíneas herbáceas polinizadas pelo vento (Rech *et al.*, 2014).

A dispersão dos frutos/sementes foi gradual (Figura 3.g), o que pode estar relacionada com a forma como a antese ocorreu e, conseqüentemente, com a maturação fisiológica dos frutos/sementes, iniciando do ápice da inflorescência para a base. As espécies do gênero *Elionurus* apresentam ráquis frágil, onde o nó pode muitas vezes cair juntamente com a espiguetas séssil. Dentre as estruturas botânicas, o calo é uma estrutura nodal, que se encontra paralelamente à articulação dos nós, que pode variar de formato de acordo com a espécie do gênero, e está diretamente relacionado com a dispersão do fruto (Vegetti & Antón, 1998; Castro & Ramos, 2003; Füller, 2013). Foi observado que os frutos de *E. muticus* são indeiscentes e secos, do tipo cariopses oblongas, com uma única semente. As sementes são de pequeno tamanho, com uma leve variação do tamanho e de coloração, que varia do amarelo-claro ao amarelo-queimado.

As inflorescências com aspecto de que o ciclo reprodutivo estava completo (Figura 3.h-i), finalizando com a formação das sementes, foram coletadas ao longo do período, evitando o início da dispersão. As primeiras inflorescências foram coletadas no dia 20 de fevereiro de 2017 e as coletas foram realizadas diariamente, até o dia 22 de março de 2017. Com isso, foi possível quantificar o número de inflorescências coletadas, o número aproximado de sementes por inflorescência, o número total de sementes trilhadas e relacionando essas informações com a temperatura na casa de vegetação durante o período (Figura 4).

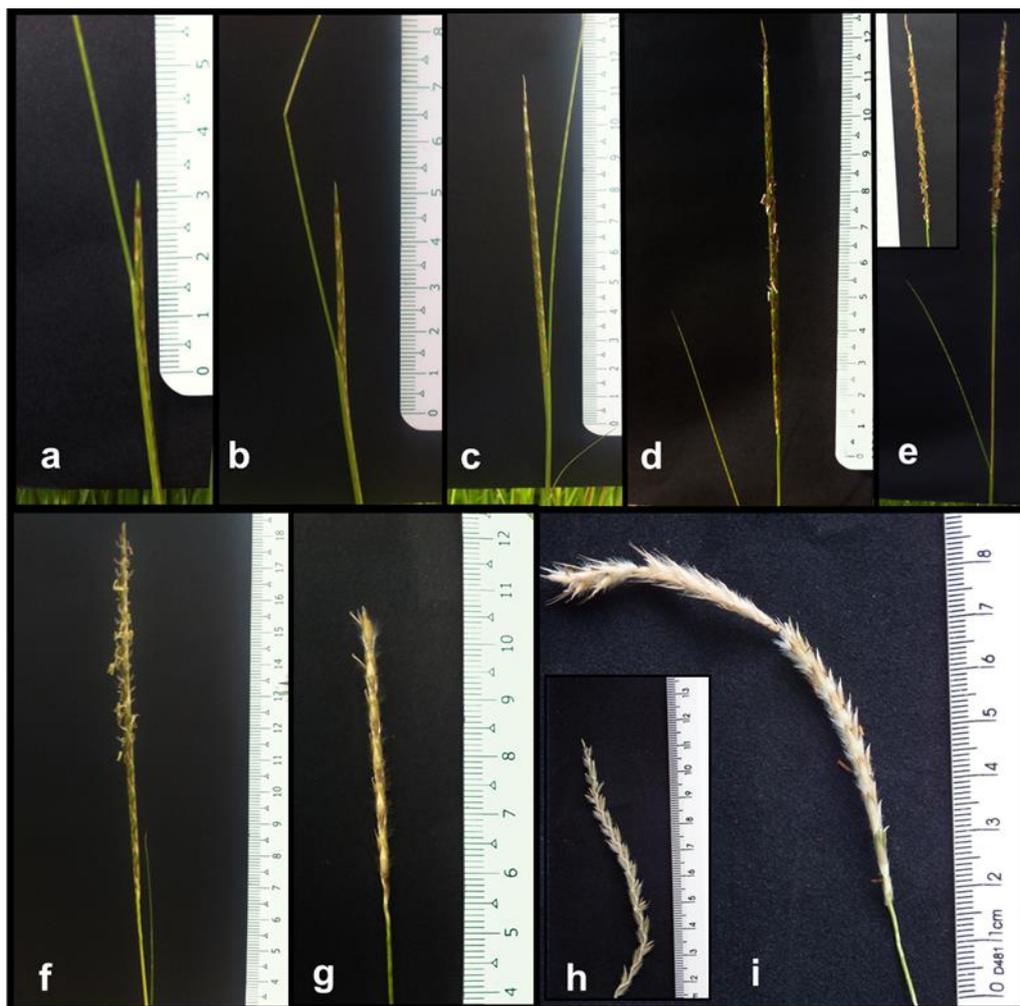


FIGURA 3. Estádios do florescimento de *Elionurus muticus*; a) Início da emissão do primórdio da inflorescência; b) segundo dia após a emissão inicial; c) terceiro dia após a emissão inicial; d) quinto dia após a emissão inicial (iniciando antese); e) oitavo dia após a emissão inicial e em destaque inflorescência em antese; f) inflorescência em antese sequencial, iniciando no ápice; g) inflorescência com ápice disperso; h-i) inflorescências polinizadas, com frutos/sementes formados e em início de dispersão. Porto Alegre/RS. 2017.

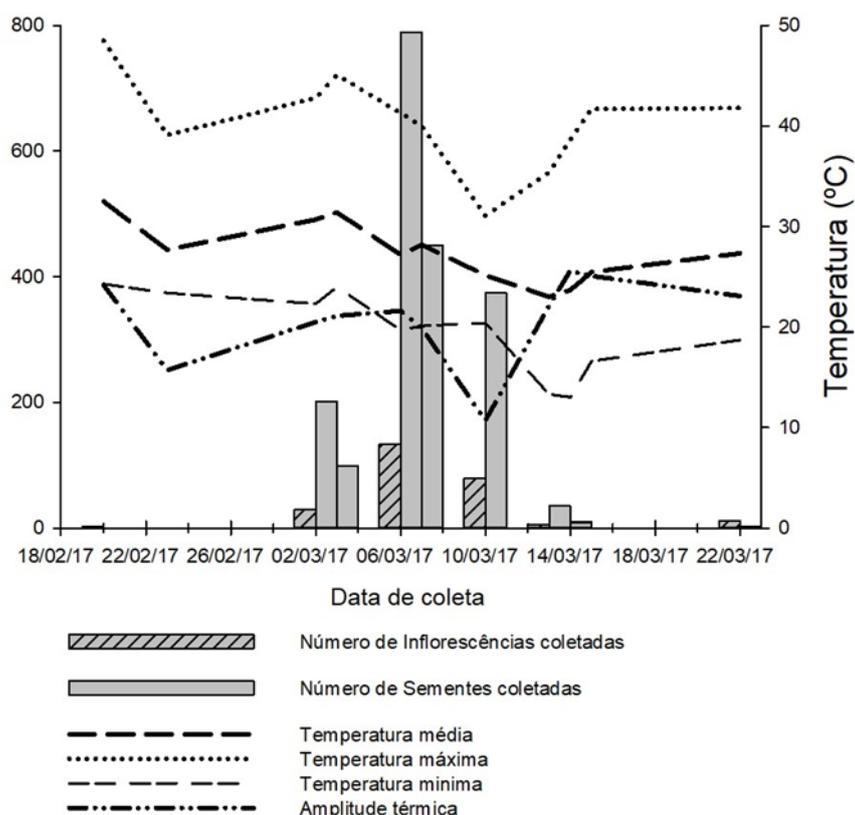


FIGURA 4. Número de inflorescências coletadas, número de sementes coletadas de *Elionurus muticus*, relacionadas com as temperaturas na casa de vegetação durante o período. Porto Alegre/RS. 2017.

Ao avaliar o número de sementes formadas em uma inflorescência inteira, isto é, que não apresentou perda da parte apical devido ao início da dispersão, foi possível verificar uma variação no número de sementes produzidas. Foram analisadas 93 inflorescências individuais, onde a que apresentou maior número de sementes produziu 30 sementes, enquanto que outras, mesmo tendo aparência de maturação do florescimento e formar uma inflorescência inteira, não apresentaram formação de sementes, sendo, a média geral de sementes em uma inflorescência de $6,04 (\pm 6,38)$ sementes. Essas variações podem estar relacionadas com fatores fisiológicos da planta, temperatura do ambiente, fatores bióticos e abióticos. De uma maneira geral, temperaturas moderadas em Poaceae podem aumentar o tamanho das inflorescências e pequenas variações na temperatura do ar podem

provocar grandes mudanças no florescimento e na fertilidade do pólen (Ryle & Langer, 1963; Heide, 1982; Araldi *et al.*, 2010). A temperatura pode ter influenciado no florescimento, já que durante todo o período do estudo, o florescimento dos indivíduos e, conseqüentemente, a formação de sementes, ocorreram nos períodos em que a temperatura na casa de vegetação eram mais elevadas e apresentando uma amplitude térmica média de 21°C (\pm 4°C) (Figura 4).

A coleta diária das inflorescências seguiu o critério visual, sendo coletadas aquelas inflorescências que apresentavam coloração amarelada, aspecto de amadurecimento e possível formação de sementes, bem como, aquelas que já apresentavam início de dispersão. O número total de inflorescências, parciais e inteiras, coletadas no período foi de 354 e o número total de sementes trilhadas foi de 1960, resultando em uma média geral de sementes coletadas/inflorescência de 5,54 (Tabela 3). Da mesma forma que as altas temperaturas podem ter influenciado o florescimento, podem ter interferido na formação das sementes.

São escassos os trabalhos que abordam exclusivamente o florescimento de *E. muticus*, essas informações são de grande importância para o conhecimento da espécie e criação de estratégias relacionadas ao manejo, bem como servindo de informações para o possível melhoramento genético da espécie.

TABELA 3. Número de inflorescências coletadas por dia, número total de sementes trilhadas e número médio de sementes por inflorescência de *Elionurus muticus*, origem São Borja/RS, cultivadas em casa de vegetação. Porto Alegre/RS. 2017.

Data da coleta	Nº de inflorescências	Nº de sementes
20/02/2017	3	0
23/02/2017	1	0
02/03/2017	30	201
03/03/2017	9	99
06/03/2017	133	789
07/03/2017	57	450
10/03/2017	79	374
13/03/2017	5	35
14/03/2017	16	9
15/03/2017	10	0
22/03/2017	11	3
Total	354	1960
Média	-	5,54

4.3 Caracterização e viabilidade das sementes

4.3.1 Caracterização

As sementes de *E. muticus* apresentam coloração que pode variar do amarelo-claro ao amarelo-queimado (Figura 5.a) e formato elíptico/oblongo (Figura 5.b). Ao analisar as medidas das sementes foi possível verificar que em média as sementes apresentaram 0,989 ($\pm 0,046$) mm de largura e 3,058 ($\pm 0,108$) mm de comprimento e o peso de 25 sementes teve em média 35,25 mg ($\pm 4,29$).

De acordo com as Regras de Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 2009), o peso de mil sementes é utilizado para calcular a densidade de semeadura, o peso de sementes por embalagem e o peso da amostra de trabalho para análise de pureza, além de ser uma informação que indica o tamanho das sementes, principalmente quando a espécie não é especificada na RAS.



FIGURA 5. a) Diferenças na coloração das sementes de *Elionurus muticus*; b) Semente individual (C= comprimento; L= largura). Porto Alegre/RS. 2017.

Devido a metodologia empregada para determinar o peso de mil sementes necessitar de um número expressivo de sementes e repetições, não foi possível determinar essa variável. No entanto, com o conhecimento do peso de 25 sementes (35,25 mg) é possível extrapolar esse dado e enquadrar as sementes de *E. muticus* na classificação de semente pequena. Já que pela RAS, sementes pequenas são aquelas com um tamanho tal que o peso de mil sementes é menor do que 200g (Brasil, 2009).

4.3.2 Germinação e vigor

Com base nos dados da análise de variância da Tabela 4, foi possível verificar que a germinação das sementes de *E. muticus* pode sofrer interferência sob temperaturas mais baixas. As sementes não apresentaram germinação nas temperaturas 5° e 10°C, diferindo estatisticamente das demais temperaturas e apresentaram germinação a partir de 15°C, não apresentando diferença estatística

entre as porcentagens de germinação (%G) para as demais temperaturas (Tabela 4). A partir desses resultados é possível determinar a faixa de temperatura mínima para germinação, sendo essa entre 10° e 15°C. Baixas temperaturas, além de determinar redução na porcentagem de germinação, reduzem o processo, devido à redução das atividades enzimáticas no metabolismo (Matheus & Lopes, 2009).

A temperatura determina a taxa de germinação, com a temperatura ótima propiciando uma porcentagem máxima em menor espaço de tempo, enquanto que temperaturas máximas e mínimas resultam em pequenas porcentagens de germinação ou a morte do embrião (Carvalho & Nakagawa, 2012). Não foi possível determinar a faixa de temperatura máxima para a germinação, pois a temperatura máxima testada (30°C) não apresentou redução significativa na germinação. A temperatura mínima para a maioria das espécies vegetais, geralmente, tem valores inferiores a 15°C, a máxima entre 35° e 40°C e a ótima entre 20° e 30°C (Marcos-Filho, 2015). As sementes de espécies de regiões temperadas geralmente germinam entre 0° e 35°C, enquanto as de regiões tropicais germinam entre 10° e 45°C (Mwale *et al.*, 1994).

A temperatura é responsável por regular a germinação, especialmente por alterar a velocidade de absorção de água e modificar a velocidade das reações químicas que acionam o desdobramento e transporte das reservas (Bewley *et al.*, 2013). Ela exerce uma forte influência na germinação, sendo considerada ótima a temperatura na qual a semente expressa seu potencial máximo de germinação no menor espaço de tempo (Carvalho & Nakagawa, 2012). No entanto, as temperaturas mais apropriadas para a germinação, assim como temperaturas limitantes, podem variar entre indivíduos e populações (Labouriau, 1983; Baskin & Baskin, 1998; Ramos & Varela, 2003).

TABELA 4. Porcentagem de germinação (%G), tempo inicial de germinação (Ti), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG) das sementes de *Elionurus muticus* submetidas a diferentes temperaturas e luminosidade. Porto Alegre/RS. 2017.

Temp.	Luz	Ti (dia)	%G	IVG	TMG (dia)	VMG
5°	12 h	0 d	0 b	0,0 d	0,0 e	0,000 d
10°	12 h	0 d	0 b	0,0 d	0,0 e	0,000 d
15°	12 h	6,75 a	60 a	1,4 cd	11,2 a	0,089 c
20°	12 h	3,5 b	75 a	3,1 bc	7,0 b	0,144 bc
25°	12 h	2,5 b	83 a	4,8 ab	5,2 bcd	0,190 ab
30°	12 h	2,25 b	76 a	3,9 b	6,4 bc	0,157 bc
20/30°	8 h	2,25 b	72 a	4,7 ab	4,7 cd	0,219 ab
†25°	12 h	2,5 b	79 a	4,8 ab	5,1 bcd	0,210 ab
*25°	0 h	2,0 b	81 a	6,7 a	3,9 d	0,266 a
CV (%)		26,71	18,39	27,18	17,55	24,99

Temp.= temperatura; †fotoblasto positivo; *fotoblasto negativo. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

O tempo inicial de germinação consiste no primeiro dia em que as primeiras sementes apresentam protrusão da radícula, iniciando a germinação, e serve como informação para a primeira contagem. Para a espécie estudada foi observado que as sementes submetidas a temperatura de 15°C apresentaram maior tempo para iniciar a germinação, média de 6,7 dias, diferindo significativamente das demais temperaturas. E em temperaturas mais elevadas, a partir de 25°C, e na ausência de luz (fotoblasto negativo/25°C), o início da germinação foi mais rápido, entre 2,5 a 2 dias, respectivamente (Tabela 4). A partir do conhecimento desse dado é possível pré-estabelecer a partir de quantos dias, após a semeadura, é viável realizar a primeira contagem.

A primeira contagem de germinação é uma avaliação realizada em conjunto com o teste de germinação, e registra a porcentagem de plântulas normais, na data prescrita pela RAS (Brasil, 2009). O número de dias para a primeira contagem, considerando a temperatura mais alta recomendada, é aproximado e um desvio de

um a três dias é permitido, desde que seja suficiente para a avaliação das plântulas (Brasil, 2009). De acordo com a RAS, a primeira contagem, para espécies de Poaceae, como, *Coix lacryma-jobi* pode ser realizada entre sete e dez dias, para *Andropogon gayanus* Kunth, oito dias, *A. gerardii* Vitman, sete dias e *A. halli* Hack., dez dias, *Paspalum notatum* Flügge, sete dias (Brasil, 2009), no caso de *E. muticus* a primeira contagem mais adequada deveria ser entre quatro e oito dias. Como a germinação de sementes de *E. muticus* não está descrita pela RAS, esses resultados podem ser utilizados para novas pesquisas. Além disso, a primeira contagem do teste de germinação pode ser utilizada como um teste de vigor, uma vez que a velocidade de germinação é reduzida com o avanço da deterioração da semente. Assim, amostras que apresentam maiores valores de germinação na primeira contagem podem ser consideradas mais vigorosas (Nakagawa, 1999).

O maior índice de velocidade de germinação (IVG) encontrado foi para o tratamento fotoblasto negativo (6,7) seguido pelo fotoblasto positivo (4,8) e pelas temperaturas constante 25° e alternada 20/30°C, com 4,8 e 4,7 respectivamente, e que não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 4), de acordo com Maguire (1962), quanto maior o IVG, maior é a velocidade de germinação.

Com relação à velocidade de germinação, existem lotes ou sementes que germinam, ou emergem, mais rapidamente que outras, cuja germinação é mais lenta. Para estas situações, existem medidas que quantificam a germinação sob ponto de vista cinético, isto é, informam quanto tempo foi necessário para determinado lote de sementes germinar. Um parâmetro bastante utilizado é o tempo médio de germinação e essa informação é expressa, comumente, em horas ou dias (Ferreira & Borghetti, 2004).

O maior tempo médio de germinação (TMG) ocorreu na temperatura de 15°C, com 11,2 dias de germinação, enquanto que o fotoblasto negativo (25°C) apresentou o menor TMG, de 3,9 dias de germinação, ambos diferindo estatisticamente das demais temperaturas (Tabela 4). Os resultados obtidos indicam que a temperatura e a ausência de luz, influenciam na velocidade de germinação de *E. muticus*, além disso, em condições laboratoriais, é possível afirmar que as sementes apresentam elevado vigor.

A dormência em sementes é interpretada como uma estratégia que visa a germinação em épocas favoráveis à sobrevivência e estabelecimento das plântulas (Garwood, 1983; Veenendaal & Ernst, 1991; Veenendaal *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 2010). Com base nos resultados dos testes de germinação as sementes de *E. muticus* não apresentaram dormência. Esta informação é compatível com o trabalho de Silva & Ataroff (1985), ao estudarem a fenologia reprodutiva em seis espécies de gramíneas em savanas da Venezuela, verificaram que as sementes de três espécies, dentre elas *E. adustus* pertencente ao gênero *Elionurus*, não apresentaram dormência, germinando na mesma estação, logo após serem dispersas. A luz é um requisito inerente à germinação das sementes de algumas espécies de plantas, enquanto outras não requerem luz para germinação, e podem ser influenciadas positivamente, negativamente ou apresentarem comportamento indiferente sob efeito da luz (Vázquez-Yanes & Orozco-Segovia, 1993; Chauhan, 2016; El-Keblawy, 2017a). Aquelas que necessitam da presença de luz para germinar, são denominadas fotoblásticas positivas, quando necessitam de ausência de luz, fotoblásticas negativas e quando a luz não interfere no processo germinativo, são fotoblásticas neutras (Marcos-Filho, 2015). Analisando os resultados obtidos a espécie apresentou ser fotoblástica neutra, isto é, apresentou

germinação semelhante tanto na presença de luz, quanto na ausência. Tendo um melhor desempenho quando submetida ao escuro constante, apresentando uma elevada %G (81%), IVG (6,7) e VMG (0,266), e baixo TMG (3,9 dias) (Tabela 4).

A figura 6 permite comparar as porcentagens de germinação acumulada e a porcentagens de germinação diária entre os tratamentos fotoblástico negativo e positivo, mostrando que ambos apresentaram um padrão de germinação semelhante ao longo do período de avaliação.

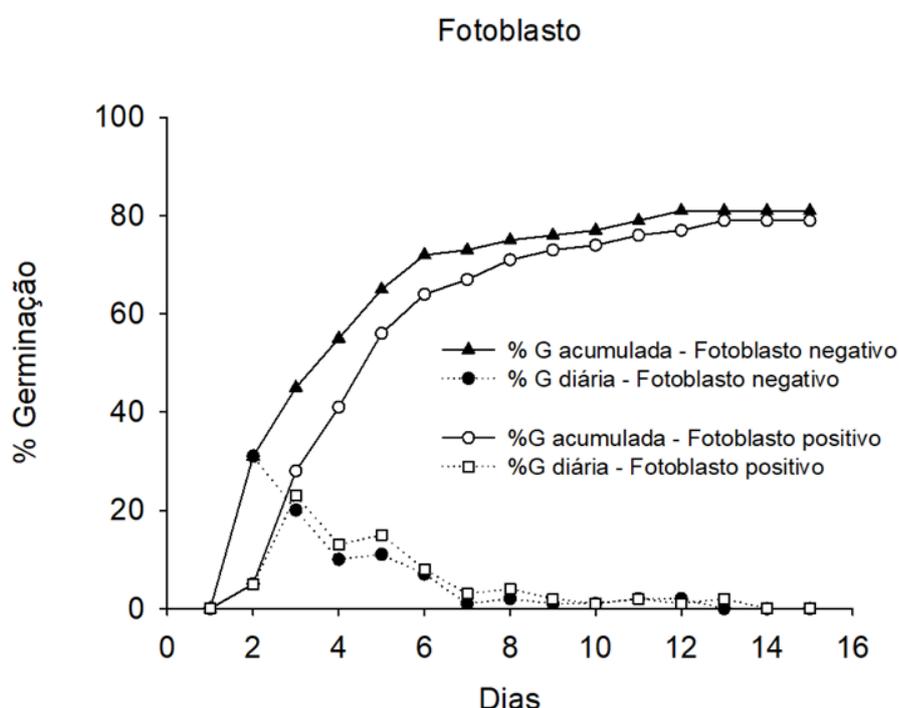


FIGURA 6. Comparação das porcentagens de germinação acumulada, porcentagens de germinação diária entre os tratamentos fotoblasto negativo ($25^{\circ}\text{C}+0\text{hs}$ de luz) e fotoblasto positivo ($25^{\circ}\text{C}+12\text{hs}$ de luz). Porto Alegre/RS. 2017.

O conhecimento do requerimento de luz das espécies permite determinar o padrão de emergência em relação à profundidade de semeadura, como no caso de espécies que necessitam de luz para a germinação, não ocorrendo germinação quando semeadas profundamente no solo (Awan *et al.*, 2014; Chauhan, 2016; Ozaslan *et al.*, 2017).

Marques (2009) avaliou a influência da luminosidade na germinação das sementes de *Passiflora setacea* DC. e classificou as sementes como insensíveis à luz, por germinarem tanto na ausência quanto na presença de luz, além disso, verificou que na ausência de luz ocorreram aumentos significativos no processo germinativo, da mesma forma em que ocorreu com as sementes de *E. muticus*. Esse resultado em *P. setacea* foi relacionado à possível presença do fitocromo na forma ativa suficiente para induzir a germinação na ausência de luz e na forma PrA , que controla a germinação através da resposta da fluência muito baixa, como descrito por Takaki (2001), que associa o fotoblastismo a formas de fitocromo e mecanismos de ação.

O fotoblastismo foi avaliado em sementes de três espécies de *Lippia* (*Lippia turbinata* f. *turbinata* Griseb., *L. turbinata* f. *magnifolia* Moldenke, *L. integrifolia* Griseb) e *Aloysia citriodora* Palau, ambas são consideradas plantas aromáticas e medicinais e pertencentes a família Verbenaceae. Foi observado para as sementes de *L. turbinata* f. *turbinata* e *L. turbinata* f. *magnifolia*, que a germinação ocorreu apenas em condições de luz, enquanto que para *L. integrifolia* e *A. citriodora*, a germinação ocorreu na luz e no escuro, no entanto foi significativamente mais alta na luz, concluindo que todas as espécies são fotoblástica positiva (Galíndez *et al.*, 2016). Os autores relacionaram o fotoblastismo positivo ao tamanho das sementes, pois, a germinação de sementes desencadeada pela exposição de luz é relatada para muitas espécies e tem sido associada a diferentes atributos da planta, incluindo a massa de sementes (Milberg *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2003; Galíndez *et al.*, 2009; Ortega-Baes *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2011; Baskin & Baskin, 2014; Galíndez *et al.*, 2016).

No entanto, *E. muticus* não se enquadrou nessa associação, já que apresenta sementes pequenas e que apresentaram uma boa germinação no escuro. Em contrapartida, El-Keblawy (2017b) observou o efeito da luz e temperatura na germinação de oito espécies de gramíneas anuais, sendo quatro naturais de locais arenosos e quatro de locais perturbados, do deserto árabe, relacionando ao tamanho das sementes. E as sementes de locais perturbados germinaram em uma ampla faixa de temperaturas e todas espécies apresentaram ser fotoblásticas positiva, exceto *Chloris virgata* que apresentou ser fotoblástica neutra, enquanto que para as sementes de locais arenosos os intervalos de temperatura foram mais estreitos e específicos, e somente *Coelachyrum brevifolium* apresentou ser fotoblástica negativa, concluindo que o fotoblastismo de sementes depende mais do tipo de habitat, do que da massa de sementes.

O número de plântulas normais (PN), anormais (PA) e sementes murchas (SM) (Figura 7) obtidas não diferiram estatisticamente entre as diferentes temperaturas e luminosidade, enquanto que o número de sementes duras (SD) apresentou diferença, sendo na temperatura de 15°C a maior ocorrência de sementes duras (4,25) e nas temperaturas mais elevadas (25°, 30° e 20/30°C) a menor ocorrência (0,25) (Tabela 5). As sementes duras são aquelas que permanecem, no final do teste, com aspecto de sementes recém colocadas no substrato (Brasil, 2009), no caso, a maior ocorrência foi na temperatura 15°C, de acordo com os resultados uma temperatura baixa para a espécie. Temperaturas baixas tendem a reduzir a atividade cinética das moléculas, reduzindo a velocidade das reações químicas e, conseqüentemente, reduzindo a germinação das sementes de algumas espécies.



FIGURA 7. Plântulas de *Elionurus muticus*, após 15 dias de germinação das sementes submetidas a diferentes temperaturas e luminosidade. a) Plântula anormal (PA) e normal (PN) germinadas a temperatura alternada 20/30°C e fotoperíodo 8 horas na maior temperatura; b) Plântula anormal (PA) e normal (PN) germinadas a temperatura constante 30°C e fotoperíodo 12 horas; c) Plântulas normais germinadas a temperatura constante 25°C- seta indica plântula normal germinada sem incidência de luminosidade (fotoperíodo 0 horas); d) plântulas anormais germinadas a temperatura contante 25°C e fotoperíodo 12 horas (fotoblasto positivo); e) plântulas anormais germinadas a temperatura constante 25°C e fotoperíodo 0 horas (fotoblasto negativo); f) plântulas anormais germinadas a temperatura constante 30°C e fotoperíodo 12 horas. Porto Alegre/RS. 2017.

TABELA 5. Médias do número de plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), sementes duras (SD) e sementes murchas (SM) obtidas de sementes de *Elionurus muticus*, submetidas à germinação em diferentes temperaturas e luminosidade. Porto Alegre/RS. 2017.

Temp.	Luz	PN	PA	SD	SM
5°	12 h	-	-	-	-
10°	12 h	-	-	-	-
15°	12 h	13,25 a	1,75 a	4,25 a	5,75 a
20°	12 h	17,25 a	2,00 a	2,50 ab	3,25 a
25°	12 h	19,75 a	1,00 a	0,25 b	4,00 a
30°	12 h	16,00 a	3,00 a	0,25 b	5,75 a
20/30°	8 h	17,25 a	4,75 a	0,25 b	5,75 a
†25°	12 h	18,75 a	0,75 a	1,50 ab	3,75 a
*25°	0 h	19,00 a	1,50 a	1,00 b	3,75 a
CV (%)		18,16	154,04	90,37	56,58

Temp.= temperatura; †fotoblasto positivo; *fotoblasto negativo. Médias na coluna seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Para o comprimento de parte aérea (CPA), Comprimento de Raiz (CR) e comprimento total de plântulas (CP) (Tabela 6) de *E. muticus* foi possível observar que as temperaturas 15° e 20°C influenciaram negativamente no desenvolvimento das plântulas, apresentando uma diminuição no comprimento em todos os parâmetros avaliados e diferindo significativamente das demais temperaturas. A temperatura de 25°C, mesmo não diferindo estatisticamente das temperaturas 30° e 20°/30°C, foi a que apresentou o maior desenvolvimento para os parâmetros, enquanto que a 30°C apresentou uma pequena redução. Em relação ao tratamento fotoblasto negativo, apresentou uma redução nos comprimentos medidos, principalmente no comprimento da raiz (0,829), além disso as plântulas obtidas através da germinação de sementes sem luminosidade apresentaram coloração esbranquiçada, ou seja sem clorofila (Figura 8). De acordo com Majerowicz & Peres (2004), em geral, as plântulas crescidas no escuro são estioladas, apresentando tipicamente caule alongado, ausência de clorofilas, folhas ou cotilédones não expandidos.

Sementes que originam plântulas com maiores valores de comprimento da parte aérea e massa verde ou seca, em um mesmo período de tempo, são consideradas mais vigorosas (Aosa, 2009). De acordo com os resultados obtidos, as sementes germinadas a temperatura de 25°C, independente da luminosidade, apresentaram maior vigor.

TABELA 6. Médias do comprimento de plântulas (CP), comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) obtidas de sementes de *Elionurus muticus*, submetidas à germinação em diferentes temperaturas e luminosidade. Porto Alegre/RS. 2017.

Temp.	Luz	CP (cm)	CPA (cm)	CR (cm)
5°	12 h	-	-	-
10°	12 h	-	-	-
15°	12 h	0,772 c	0,509 b	0,263 b
20°	12 h	2,113 bc	1,372 b	0,743 ab
25°	12 h	4,501 a	3,274 a	1,332 a
30°	12 h	3,466 ab	2,483 a	0,982 a
20/30°	8 h	3,891 a	2,873 a	1,018 a
†25°	12 h	4,624 a	3,368 a	1,255 a
*25°	0 h	3,667 a	2,837 a	0,829 ab
CV(%)		20,48	19,79	32,16

Temp.= temperatura; †fotoblasto positivo; *fotoblasto negativo. Médias na coluna seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

A distribuição da frequência relativa de germinação, em função do tempo, para as sementes de *E. muticus* mostrou picos de germinação entre o 3° e 10° dia após a semeadura (Figura 9). A frequência relativa de germinação permite observar a distribuição da germinação ao longo do tempo. Por meio das frequências é possível visualizar se ao longo do período de avaliação as sementes germinam até atingir um valor máximo e depois declinam, ou se a germinação atinge o máximo, declina e volta a germinar (Santana & Ranal, 2004).

Foi observado que todas as temperaturas estudadas apresentaram mais de um pico de frequência, mostrando que as sementes não apresentaram uma homogeneidade na germinação, o que pode ser em função da espécie não ser domesticada. O pico máximo de germinação na maioria das temperaturas ficou

entre o 3º e o 6º dia, no caso das sementes germinadas na temperatura 15°C os picos ocorreram a partir do nono dia, já na temperatura 30°C a germinação apresentou oscilações na frequência, alternando porcentagens de germinação diária maiores e menores. Como a germinação das sementes, em geral, não é perfeitamente sincronizada, o conhecimento da velocidade de germinação, rapidez, frequência e sincronismo são importantes pois permitem reduzir o grau de exposição das sementes e plântulas a fatores adversos (Marcos Filho, 2015).

Os resultados obtidos para a espécie *E. muticus*, no presente trabalho, são inéditos e servem como parâmetro e informação para novas pesquisas, a partir dos resultados é possível definir que a temperatura ótima para a espécie *E. muticus* é de 25°C, pois, em todos os tratamentos em que as sementes foram submetidas a essa temperatura, apresentaram uma elevada porcentagem de germinação, IVG e TMG. Além disso, a espécie pode ser considerada fotoblástica neutra, germinando tanto na luz, quanto no escuro.

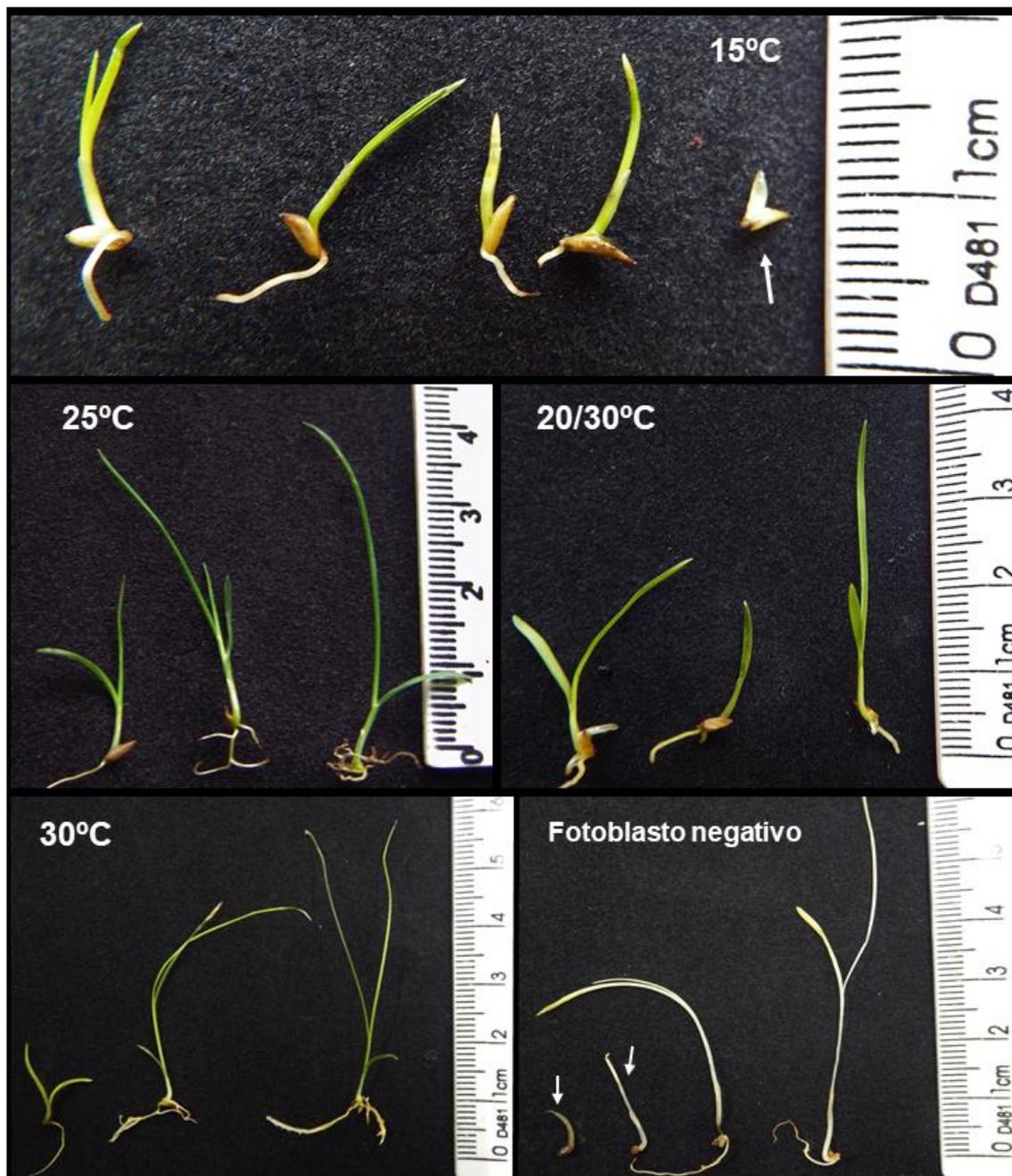


FIGURA 8. Plântulas de *Elionurus muticus*, após 15 dias de germinação submetida a diferentes temperaturas e luminosidade. (Temperaturas 15°, 25° e 30°C – fotoperíodo 12 horas; temperatura alternada 20/30°C – fotoperíodo 8 horas; fotoblasto negativo – temperatura 25°C e fotoperíodo 0 horas). Setas indicam plântulas anormais, sem desenvolvimento de radícula. Porto Alegre/RS. 2017.

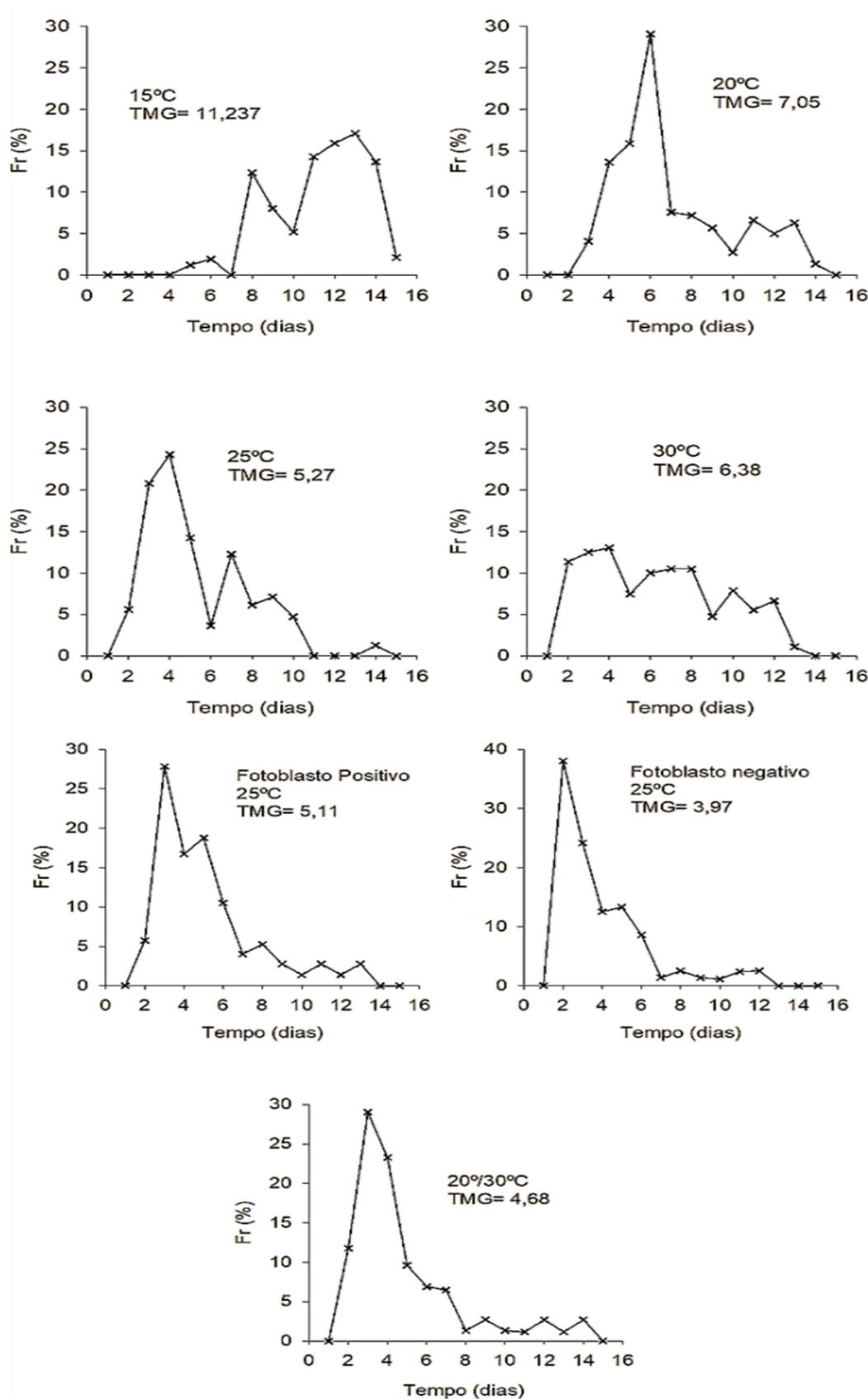


FIGURA 9. Frequência relativa da germinação de sementes de *Elionurus muticus* submetidas a diferentes temperaturas e luminosidade. TMG=tempo médio de germinação (dias). Porto Alegre/RS. 2017.

4.4 Determinação do sistema de cruzamento de *E. muticus*

4.4.1 Determinação do protocolo isoenzimático para a espécie *Elionurus muticus*

As tabelas 7 e 8 apresentam os resultados dos sistemas enzimáticos e seus respectivos tampões e as formas de armazenamento das folhas de matrizes e progênes. Foi possível observar que as folhas congeladas das matrizes, bem como as folhas refrigeradas das progênes não apresentaram perfis eletroforéticos satisfatórios. E a atividade enzimática de alguns sistemas como ACP, GIDH, LAP, ADH, G2DH, GOT e DIA foi reduzida, ou nula, comprometendo a resolução dos zimogramas.

Os melhores resultados foram obtidos com folhas frescas, recém coletadas, e mantidas refrigeradas, por um período de 24 horas até a realização das análises, tanto para matrizes quanto para progênes, sendo a forma mais adequada para a manutenção da atividade enzimática de folhas de *E. muticus*. A escolha do material para ser utilizado em eletroforese pode ser fundamental para a obtenção de extratos com enzimas ativas (Montagna *et al.*, 2013).

Dos 23 sistemas testados para o estabelecimento do protocolo, 12 apresentaram nítida resolução. Preliminarmente, foram selecionadas as enzimas: PGI, PGM, PRX, MDH, 6GPDH e NADHHDH para o tampão Tris-citrato; e ME, IDH, β EST. SKDH e GDH para o tampão Citrato de morfolina, no entanto, para a determinação do sistema reprodutivo foram utilizadas apenas as enzimas: PRX, PGI, MDH, 6PGDH, PGM, ME e β EST, pois foram os sistemas que apresentaram melhor resolução dos zimogramas, possibilitando interpretar os resultados com maior precisão.

TABELA 7. Sistemas enzimáticos testados em tampão de corrida Tris-citrato em folhas coletadas de matrizes e progênies, diferentes formas de armazenamento, para o protocolo isoenzimático em *Elionurus muticus*. Porto Alegre/RS. 2017.

Sistema enzimático	Matriz		Progênie	
	Fresca	Congelada	Fresca	Refrigerada
PGI-2	MB	R	MB	B
PGI-1	R	R	R	N
6PGDH	MB	s.a.	MB	s.a.
MDH-1	MB	R	MB	s.a.
MDH-2	R	R	B	R
ACP	R	R	R	R
PGM-1	MB	s.a.	MB	s.a.
PGM-2	MB	s.a.	R	s.a.
G6PDH	R	s.a.	B	s.a.
ME-1	R	s.a.	R	s.a.
ME-2	MB	s.a.	R	s.a.
PRX-1	MB	MB	R	R
PRX-2	MB	MB	R	R
PRX-3	MB	MB	R	R
α-EST	MB	MB	MB	MB
IDH	B	R	R	s. a.
NADHDH	MB	s. a.	MB	s. a.
SKDH	B	s. a.	MB	s. a.
GIDH	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.
LAP	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.
ADH	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.
G2DH	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.
GOT	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.
DIA	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.

Legenda: resolução muito boa (MB), resolução regular (B), resolução ruim (R), sem atividade (s.a.).

TABELA 8. Sistemas enzimáticos testados em tampão de corrida Tris-Citrato (CT) e tampão de corrida Citrato de morfina (CM) para protocolo isoenzimático de *Elionurus muticus*. Porto Alegre/RS. 2017.

Sistema enzimático	Tampão			
	TC		CM	
	Matriz Fresca	Progênie Fresca	Matriz Fresca	Progênie Fresca
ME	n.r.	n.r.	MB	MB/fraca
IDH	MB	MB	MB	MB/fraca
ACP	n.r.	n.r.	R	R
β EST	MB	MB	MB	MB
SKDH	MB	MB	MB	MB
SOD	n.r.	n.r.	s.a.	s.a.
GDH	R	R	s.a.	s.a.
SDH	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.
G6PDH	R	R	s.a.	s.a.
NADH	MB	MB	n.r.	n.r.
PRX	MB	MB	n.r.	n.r.
α EST	MB	MB	n.r.	n.r.

Legenda: resolução muito boa (MB), resolução regular (B), resolução ruim (R), sem atividade (s.a.) e não realizado (n.r.).

Os sistemas enzimáticos usados para determinar o sistema de cruzamento de *E. muticus* foram: PRX, PGI, PGM, MDH, 6PGDH, ME e β EST, totalizando oito locus, onde a enzima PGM apresentou dois locos isoenzimáticos. Todos os oito locus, revelados nos sete sistemas isoenzimáticos, foram polimórficos e segregaram de dois a quatro alelos (Tabela 9). A heterozigosidade média esperada foi de 0,2656 revelando ser um valor alto se comparado aos obtidos em outros estudos (Pinto *et al.*, 2004). Em estudos de diversidade genética foi encontrada uma heterozigosidade média de 0,160 para gimnospermas, de 0,149 para espécies de ampla distribuição, de 0,109 para espécies tropicais e de 0,123 para espécies polinizadas por vento (Hamrick & Godt, 1989; Pinto *et al.*, 2004).

TABELA 9. Sistemas enzimáticos utilizados em *Elionurus muticus*. Porto Alegre/RS. 2017.

Locus	k	N	H _{obs}	H _{esp}	P
PRX	3	275	0,393	0,424	0.339
PGI	4	211	0,355	0,346	0.319
MDH	2	209	0,005	0,005	0.005
6PGDH	3	212	0,146	0,137	0.129
PGM-1	2	222	0,261	0,284	0.243
PGM-2	3	225	0,067	0,065	0.064
β-EST	3	226	0,748	0,650	0.573
ME	2	247	0,211	0,214	0.191
Total	22	281	-	-	-
Média	2,75/locus	-	-	0,2656	0,2329

k=número de alelos; N=número de indivíduos genotipados; H_{obs}=Heterozigosidade observada; H_{esp}=Heterozigosidade esperada; P=Polimorfismo;

4.4.2 Determinação do sistema de cruzamento de *E. muticus* através de isoenzimas

O estudo do sistema reprodutivo fornece informações importantes sobre os padrões de cruzamentos e quais as melhores formas para a conservação e manejo das espécies (Oliveira *et al.*, 2002).

As estimativas de cruzamento multiloco (t_m) e uniloco (t_s), mostram o quanto de cruzamentos a espécie pratica considerando vários locos e um único loco, respectivamente. Ao analisar as famílias de *E. muticus*, considerando matrizes e progênes, as taxas de cruzamento foram altas e significativamente diferentes de um (Tabela 10). Alguns valores da estimativa de cruzamento foram acima de 2,00 (Tabela 10), o que indicam a não convergência dos dados ao modelo de cruzamento misto (Ribas & Kageyama, 2006). A diferença entre as estimativas de fecundação cruzada multiloco e uniloco ($t_m - t_s$) variou de -0,273 (Família SB 15 clone) a 0,320 (Família SB 67), sendo negativa em 8 famílias, indicando que não ocorreram acasalamentos entre indivíduos aparentados dentro dessas famílias avaliadas (Ritland, 2002). As famílias cuja a diferença t_m-t_s foi positiva podem ser

provenientes de acasalamentos entre parentes, sendo a família SB 67 a com maior ocorrência de cruzamento entre indivíduos aparentados (32%). A redução do tamanho original da população e, conseqüentemente, do número de indivíduos reprodutivos aumenta a probabilidade de cruzamento entre indivíduos aparentados, e isto, a longo prazo, pode proporcionar a perda da diversidade genética nas populações remanescentes devido aos fatores associados com endogamia e deriva genética (Menges, 1991; Ellstrand & Elam, 1993; Ribas, 2003).

Existem poucos estudos com o uso de marcadores isoenzimáticos em espécies da família Poaceae (Angelov, 2006). Em geral, os estudos realizados estão relacionados à diversidade e à variabilidade genética (Millach, 1998) ou como auxílio na identificação quimiotaxonômica de espécies, principalmente medicinais e aromáticas (Lopes *et al.*, 2003). Estudos do sistema de cruzamento baseado em dados isoenzimáticos foram realizados em diversas espécies perenes, sendo a sua maioria em espécies florestais como *Eucalyptus urophylla* (House & Bell, 1994), *Acacia milotica* (Mandal & Ennos, 1995), *Fagus sylvatica* (Rossi *et al.*, 1996), *E. marginata* (Millar *et al.*, 2000); *Copaifera langsdorfii* (Oliveira *et al.*, 2002), *Caesalpinia echinata* (Giudice Neto *et al.*, 2005), *Eschweilera ovata* (Gusson *et al.*, 2006), entre outras, e em algumas anuais, como *Dasypyrum villosum* (Pace & Qualset, 1995) e *Bromus intermedius* (Oja, 2005).

TABELA 10. Taxa individual de cruzamento multiloco e uniloco por família de *Elionurus muticus*, através de análise isoenzimática. Porto Alegre/RS. 2017.

Família	N	t_m	t_s	$t_m - t_s$
SB 8	15	0,798 ($\pm 0,338$)	0,828 ($\pm 0,254$)	-0,030
SB 15 clone	15	1,104 ($\pm 0,439$)	1,377 ($\pm 0,379$)	-0,273
SB 31 clone	15	1,057 ($\pm 0,174$)	0,887 ($\pm 0,118$)	0,170
SB 41	15	0,859 ($\pm 0,137$)	0,638 ($\pm 0,160$)	0,221
SB 45 clone	15	1,463 ($\pm 0,171$)	1,303 ($\pm 0,205$)	0,160
SB 46 clone	15	0,831 ($\pm 0,205$)	0,933 ($\pm 0,267$)	-0,102
SB 49	15	0,983 ($\pm 0,121$)	1,218 ($\pm 0,235$)	-0,235
SB 51	15	0,914 ($\pm 0,157$)	0,645 ($\pm 0,113$)	0,269
SB 53	15	1,324 ($\pm 0,165$)	1,269 ($\pm 0,121$)	0,055
SB 56	15	1,417 ($\pm 0,106$)	2,015 ($\pm 0,261$)	-0,598
SB 62	15	1,716 ($\pm 0,257$)	1,700 ($\pm 0,235$)	0,016
SB 63	15	1,096 ($\pm 0,098$)	1,039 ($\pm 0,199$)	0,057
SB 67	15	1,163 ($\pm 0,202$)	0,843 ($\pm 0,214$)	0,320
SB 73	11	0,688 ($\pm 0,226$)	0,744 ($\pm 0,219$)	-0,056
SB 81	15	1,243 ($\pm 0,151$)	1,387 ($\pm 0,110$)	-0,144
SB 85	12	1,163 ($\pm 0,043$)	0,908 ($\pm 0,070$)	0,255
SB 88	15	1,045 ($\pm 0,072$)	1,285 ($\pm 0,219$)	-0,240
SB 93	14	0,950 ($\pm 0,093$)	0,646 ($\pm 0,176$)	0,304
População	281	0,996($\pm 0,074$)	1,026($\pm 0,067$)	- 0,030 ($\pm 0,065$)

t_m =taxa de cruzamento multiloco; t_s =taxa de cruzamento uniloco; $t_m - t_s$ =taxa de cruzamento entre parentes; N=número de progênies.

O resultado encontrado para o coeficiente de endogamia das matrizes ($F = 0,073$) (Tabela 11) mostrou que as matrizes não são aparentadas. A ausência de endogamia dos genitores pode ser explicada em função da procedência das matrizes, já que a população estudada é formada de plantas transplantadas de diferentes locais de uma região do município de São Borja/RS.

Na análise combinada para todas as famílias, as taxas de fecundação cruzada multiloco ($t_m = 0,996$) e uniloco ($t_s = 1,026$) foram altas (Tabela 11). Os valores de t_m e t_s diferiram estatisticamente de zero, evidenciando que *E. muticus* é uma espécie de reprodução cruzada preferencial, com uma taxa de autofecundação muito pequena ($s=1-t_m$) de 0,004, que não diferiu significativamente de zero (Tabela 11). Tratando, portanto, de uma espécie alógama, uma vez que, a taxa de cruzamentos é superior a 95% (Karasawa, 2009).

Altas taxas de cruzamento favorecem a recombinação e a redução da endogamia (Sobierajski *et al.*, 2006).

TABELA 11. Estimativas dos parâmetros associados ao sistema reprodutivo de *Elionurus muticus*, através de análise isoenzimática. Porto Alegre/RS. 2017.

Parâmetros	Estimativas (\pm DP)
Coeficiente materno de Endogamia: F	-0,073 (\pm 0,078)
Taxa de cruzamento multiloco: t_m	0,996 (\pm 0,074)
Taxa de cruzamento uniloco: t_s	1,026 (\pm 0,067)
Taxa de cruzamento entre parentes: $t_m - t_s$	- 0,030 (\pm 0,065)
Taxa de autofecundação : ($S = 1 - t_m$)	0,004
Correlação de autofecundação: r_s	0,999 (\pm 0,914)
Correlação de paternidade multilocos: $r_{p(m)}$	0,200 (\pm 0,048)
Correlação de paternidade uniloco: $r_{p(s)}$	-0,999 (\pm 0,014)
Diferença [$r_{p(s)} - r_{p(m)}$]	-1,199 (\pm 0,051)
Número médio de polinizadores: $N_{ep} = 1/(r_{p(m)})$	5
Proporção de irmãos-germanos ($Pic = r_{p(m)} \cdot t_m$)	19,92%
Proporção de meios-irmãos ($PMI = t_m(1 - r_{p(m)})$)	79,68%
Proporção de irmãos de autofecundação ($PIA = 1 - t_m$)	0,4%

1000 bootstrap. DP=desvio padrão.

Füller *et al.* (2015) realizaram a caracterização genética utilizando marcadores AFLP em populações naturais de *E. muticus*, incluindo uma população natural de São Borja/RS, e verificaram que as populações estudadas apresentaram alta variabilidade genética, especialmente dentro das populações, sugerindo a possível ocorrência de alogamia nas populações naturais.

A taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados da população ($t_m - t_s$) permite avaliar a ocorrência de cruzamentos entre aparentados, possibilitando a caracterização da ocorrência de endogamia por essa via (Ritland & Jain, 1981; Ritland & El Kassaby, 1985). A diferença é usada para quantificar as ocorrências de cruzamentos endogâmicos, no caso essa diferença foi negativa e significativamente diferente de zero (-0,030) sugerindo que, em geral, não há endogamia biparental (Tabela 11). O resultado demonstra, que em geral, os

indivíduos cruzam aleatoriamente, sendo um ponto positivo para a manutenção da variabilidade genética dos indivíduos, famílias e populações da espécie.

A correlação de paternidade multilocus ($r_{p(m)} = 0,200$), diz respeito à probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso, dentro de progênes, possuírem o mesmo doador de pólen, foi significativamente diferente de zero, indicando que parte dos descendentes, pelo menos 20%, compartilham o mesmo pai. Quanto maior esse valor, maior será a semelhança entre as frequências alélicas do pool de pólen e maior será a proporção de indivíduos oriundos do mesmo pai. Uma possível explicação para isso é o fato dos indivíduos da população estudada se encontrarem próximos dentro da casa de vegetação. A correlação de paternidade multilocus foi maior que a correlação de paternidade únilocus ($[r_{p(m)} - r_{p(s)}] = -1,999$), o que implica que não houve efeito da subestrutura da população entre os cruzamentos externos (Muchugui *et al.*, 2008).

A partir da correlação de paternidade é possível estimar o número médio de indivíduos polinizadores efetivos por plantas, ou seja a média dos indivíduos que contribuíram com pólen para uma planta materna, no caso $N_{ep} = 5$, considerado um número elevado de doadores de pólen.

No caso de *E. muticus*, não foi encontrado na literatura nenhum estudo abordando o sistema reprodutivo. Portanto, os resultados são originais e indicam que futuros procedimentos visando o melhoramento genético da espécie devem ser conduzidos assumindo a alogamia na espécie.

4.4.3 Determinação do sistema de cruzamento através do isolamento de inflorescências

Os resultados do isolamento de inflorescências em pré-antese estão resumidos na tabela 12. O número médio de sementes por inflorescência para ramos protegidos foi de uma semente, enquanto que para ramos não protegidos foi obtido 8,3 sementes/inflorescência. As médias diferiram estatisticamente o que sugere tratar de uma espécie preferencialmente alógama. Há evidências de variabilidade genética intrapopulacional em *E. muticus* (Füller *et al.*, 2015), essas evidências estimam de forma indireta se tratar de uma espécie alógama.

TABELA 12. Número médio de sementes por inflorescência de *Elionurus muticus* a partir de flores não protegidas (Livre) e protegidas por ensacamento. Porto Alegre/RS. 2017.

Parâmetros	Livre	Protegida
Número de plantas	13	13
Número inflorescências coletadas	17	17
Número sementes total	141	17
Número médio de sementes/inflorescência	8,3 a	1 b

Médias na linha seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Resultado semelhante foi obtido em *Lippia alba*, em que Schocken (2007) realizou o ensacamento de inflorescências antes da antese, e após o período de 40 dias, avaliou a relação peso de fruto/peso de inflorescência e o número médio de fruto/inflorescência para ramos protegidos, obtendo 4,2% e 0,69 respectivamente, enquanto que para ramos não protegidos foram obtidos os valores de 31,3% e 14,9, respectivamente, indicando ser uma espécie preferencialmente alógama.

O sistema de cruzamento preferencial de uma espécie, ou seja, se é alógama ou autógama, é de fundamental importância diante da perspectiva de se iniciar atividades de melhoramento genético, já que os procedimentos de obtenção e condução de populações híbridas são, normalmente, determinados por esta característica (Allard, 1971).

O resultado obtido no experimento de isolamento das inflorescências é compatível com os obtidos no experimento de determinação do sistema de cruzamento através de sistemas isoenzimáticos, confirmando que a espécie *Elionurus muticus* apresenta, como sistema de cruzamento, ser alógama preferencial.

4.5 Avaliação da propagação vegetativa: perfilhamento

Quando se pretende explorar economicamente uma determinada espécie vegetal, o ponto de partida deve ser o estudo das formas de propagação e se elas apresentam viabilidade para o estabelecimento de um sistema produtivo (Scheffer, 1992). Sendo assim, para viabilizar o cultivo racional de *E. muticus* é importante o estudo de métodos de propagação, como o perfilhamento, visando a caracterização da espécie.

Os tratamentos não apresentaram diferença significativa, tanto para porcentagem de pegamento, quanto para biomassa fresca (Tabela 13). As mudas com três perfilhos apresentaram menor estatura (92,44 cm), diferindo do tratamento com um perfilho (97,47 cm). Fisiologicamente era esperado que as mudas com três perfilhos apresentassem maior porcentagem de pegamento que as mudas com um perfilho, contudo esses dois tratamentos se igualaram (92,5%), enquanto que as mudas com dois perfilhos apresentaram redução na porcentagem de pega.

O perfilhamento é uma característica particular de cada espécie e geralmente é determinada por diferentes fatores, como disponibilidade de água, luz, temperatura, nutrientes, parâmetros de solo, clima, entre outros (He *et al.*, 2004; Kluse & Diaz, 2005; Skalova, 2010; Gląb *et al.*, 2015) e a ação em conjunto desses fatores pode determinar a formação ou a morte de perfilhos (Langer, 1956).

TABELA 13. Porcentagem de pegamento, altura de planta e biomassa fresca das folhas (BFF), de *Elionurus muticus* em função do número de perfilhos inicial. Porto Alegre/RS.2017.

Tratamento	% de pegamento	Altura (cm)	BFF (g)
T1	92,5 a	97,47 a	8,03 a
T2	85,0 a	93,24 ab	7,36 a
T3	92,5 a	92,44 b	7,59 a
C.V. (%)	16,27	4,10	10,55

T1-um perfilho; T2-dois perfilhos; T3-três perfilhos; Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Os perfilhos são estruturas utilizadas pelas espécies de Poaceae como estratégia para compensação de espaços vazios dentro da comunidade. São constituídos por lâmina foliar, bainha, lígula, internó, nó e gema axilar, que se diferenciam a partir de um único meristema (Briske, 1991; Barhart, 1999).

Uma das características que garante a persistência das gramíneas após o corte é a capacidade de regeneração de tecido foliar, que se dá a partir da emissão de folhas de meristemas apicais que estão abaixo do plano de corte, dos meristemas remanescentes e, ou, das estruturas que apresentam tecido meristemático, como as gemas axilares, por meio do perfilhamento. Evidenciando a importância do processo de perfilhamento, quando o meristema apical é eliminado, além da importância para o processo de rebrote após a poda (Cândido *et al.*, 2005; Fagundes *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2015).

Nunes (2008) avaliou a propagação de capim-limão (*Elionurus* sp.) em função do número de perfilhos, utilizando mudas com três, cinco, sete e nove perfilhos e concluiu que o melhor resultado para a propagação vegetativa de capim-limão, via divisão de touceiras, é obtido através de mudas contendo três perfilhos. Já, Buglia & Ming (2004) avaliaram a influência de um, dois e três perfilhos de *E. latiflorus* Nees e verificaram que plantas com um perfilho apresentaram menor porcentagem de pegamento, altura e massa seca de planta, concluindo que é necessário ao menos dois perfilhos para garantir a propagação vegetativa desta espécie, divergindo dos resultados obtidos no presente trabalho.

Em *Cymbopogon winterianus* Jowitt (capim-citronela) foi avaliado o efeito do número de perfilhos e comprimento de folha mantida na muda plantada diretamente no solo. Foram testados três números de perfilhos (1, 2, 3) e quatro comprimentos de folhas mantidas na muda (0, 3, 6 e 9 cm), e obteve o melhor perfilhamento as mudas de dois e três perfilhos, com 3 e 6 cm de comprimento. Sugerindo que o plantio direto no solo de capim-citronela pode ser recomendado usando três perfilhos por cova de plantio e mantendo entre 3 a 6 cm de lâmina foliar (Blank *et al.*, 2004b).

Com base nos resultados obtidos é possível sugerir para a propagação vegetativa de *E. muticus* a utilização de um perfilho, já que apresentou elevada porcentagem de pegamento e produção de biomassa das folhas, o que permite a obtenção de um maior número de mudas a partir da divisão de uma touceira da espécie.

4.6 Avaliação da relação tipo de biomassa, peso de biomassa e tempo de extração

O tempo de hidrodestilação, tipo e peso de biomassa são informações importantes no estudo com plantas aromáticas, pois permitem maximizar o processo de extração e a quantidade de óleo essencial produzido (Oliveira *et al.*, 2012). Alguns aspectos influenciam a produção de óleos essenciais, como os fatores genéticos e ambientais, e outros influenciam no rendimento, como o método e o tempo de extração (Costa *et al.*, 2013). A avaliação teve como objetivo otimizar as extrações de óleo essencial de *E. muticus* e verificar qual o melhor tipo de biomassa, fresca ou seca, peso de biomassa mínima e tempo de extração que são necessários para a obtenção de óleo essencial da espécie.

A partir da análise estatística foi possível verificar que para a variável volume de óleo extraído, houve interação significativa entre tipo (fresca ou seca) e peso de biomassa, bem como, diferença significativa entre os níveis de tempo de extração (Tabela 14).

TABELA 14. Resumo da análise de variância do volume (Vol), teor e rendimento de óleo essencial (Rend) de *Elionurus muticus* em relação ao tipo de biomassa, peso de biomassa e tempo de extração por hidrodestilação. Porto Alegre/RS. 2017.

Causas de variação	GL	Variáveis		
		Vol (mL)	Teor (%)	Rend (mL/planta)
Quadrado Médio				
Biomassa	1	0,3565***	0,0003 ^{ns}	0,28 ^{ns}
Peso	5	0,3478***	1,4194***	1193,73***
Tempo	5	0,0533**	0,4592**	386,21**
Biomassa X Peso	5	0,0635***	0,1272 ^{ns}	107,00 ^{ns}
Biomassa X Tempo	5	0,0015 ^{ns}	0,0733 ^{ns}	61,72 ^{ns}
Peso X Tempo	25	0,0082 ^{ns}	0,0476 ^{ns}	40,01 ^{ns}
BiomassaXPesoXTempo	25	0,0018 ^{ns}	0,0512 ^{ns}	43,06 ^{ns}
Resíduo	144	0,0127	0,1267	106,54

*** significativo $\alpha=0,01$; **significativo $\alpha=0,05$; ^{ns} não significativo.

Enquanto que as variáveis teor e rendimento de óleo apresentaram diferença significativa entre os níveis de peso de biomassa e entre os níveis de tempo de extração (Tabela 15), não apresentando interação significativa entre as variáveis.

TABELA 15. Médias do volume, teor e rendimento de óleo essencial de *Elionurus muticus* em relação ao peso de biomassa e tempo de extração. Porto Alegre/RS. 2017.

Peso (g)	Vol (mL)	Teor (%)	Rend*	Tempo	Vol (mL)	Teor (%)	Rend*
5	0,000 c	0,000 c	0,00 c	30	0,052 b	0,122 b	3,54 a
10	0,011 c	0,169 bc	4,91 bc	60	0,088 ab	0,197 ab	5,73 ab
25	0,097 b	0,506 a	14,66 a	90	0,107 ab	0,269 ab	7,80 ab
50	0,135 b	0,361 ab	10,46 ab	120	0,127 ab	0,338 ab	9,79 ab
75	0,258 a	0,488 a	14,15 a	150	0,145 a	0,383 a	11,11 a
100	0,172 b	0,201 bc	5,82 bc	180	0,155 a	0,415 a	12,04 a

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). *Rendimento=mL/planta.

Ao realizar o desdobramento da interação entre tipo de biomassa e peso de biomassa, da variável volume de óleo, foi possível observar que a amostras biomassa fresca de 75 e 100g e a amostra biomassa seca de 75g não diferiram entre si e apresentaram os maiores volumes de óleo extraído, 0,300, 0,288 e 0,216 mL, respectivamente, diferindo das demais amostras (Tabela 16). A amostra biomassa seca de 75g diferiu estatisticamente das demais amostras de biomassa seca, apresentando elevado volume de óleo extraído, dentro do fator biomassa seca. E nas amostras de 5g, tanto para biomassa fresca quanto seca, não foi possível extrair óleo essencial (Tabela 16).

TABELA 16. Médias do volume, teor e rendimento de óleo essencial de *Elionurus muticus* da interação entre tipo de biomassa e peso de biomassa da parte aérea. Porto Alegre/RS. 2017.

Biomassa	Peso (g)	Variáveis		
		Volume (mL)	Teor de óleo (%)	Rendimento (mL/planta)
Fresca	5	0,000 e	0,000	0,00
	10	0,014 de	0,139	4,03
	25	0,136 bcd	0,544	15,73
	50	0,178 abc	0,359	10,42
	75	0,300 a	0,401	11,62
	100	0,288 a	0,288	8,36
Média		0,153 A	0,288 A	8,37 A
Seca	5	0,000 e	0,000	0,00
	10	0,010 e	0,200	5,80
	25	0,058 cde	0,467	13,53
	50	0,090 cde	0,362	10,50
	75	0,216 ab	0,575	16,67
	100	0,057 cde	0,113	3,29
Média		0,072 B	0,286 A	8,30 A

Médias seguidas da mesma letra minúscula ou maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

O volume, teor e rendimento de óleo essencial também podem ser influenciados pelo peso de biomassa usado para extração, resultando em uma remoção de umidade mais eficiente ao trabalhar com quantidades menores de biomassa (Negreiros *et al.*, 2015). No caso de *E. muticus*, as menores quantidades de biomassa, seja fresca ou seca, apresentaram o menor volume, teor e rendimento de óleo. As variáveis analisadas aumentaram a medida que o peso de biomassa aumentou, até atingir o pico na amostra de 75 g e apresentar início de declínio na amostra de 100 g. (Figura 10). Um dos fatores que pode ter influenciado a redução de extração de óleo nas amostras de 100g, principalmente na amostra de biomassa fresca, seria em relação ao tamanho do balão de extração utilizado, já que a biomassa da parte aérea de *E. muticus* apresenta elevado volume de biomassa,

preenchendo o balão completamente e assim dificultando a extração de óleo essencial.

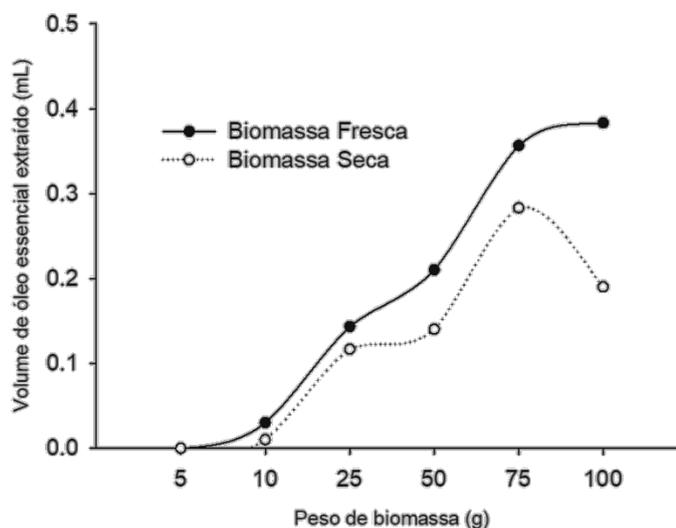


FIGURA 10. Volume de óleo extraído de *Elionurus muticus* em relação ao tipo e peso de biomassa da parte aérea. Porto Alegre/RS. 2017.

A extração de óleo essencial da biomassa fresca apresentou maior volume de óleo (0,153 mL) que a biomassa seca (0,072 mL), diferindo estatisticamente. No entanto, o teor de óleo, 0,288 e 0,286%, e rendimento, 8,73 e 8,30 mL/planta, para biomassa fresca e seca respectivamente, não diferiram (Tabela 16). Foi observada em várias espécies a influência do processo de secagem da biomassa no rendimento e composição do óleo, geralmente aumentando o rendimento e o composto majoritário (Corrêa *et al.*, 2004; Sellami *et al.*, 2011; Rahimalek & Goli 2013). O que deve estar relacionado com a forma como é calculado o teor de óleo, BLU (Base livre de umidade) e BU (Base úmida), de acordo com Santos *et al.* (2004). Em *Lippia alba*, a extração de óleo essencial das folhas frescas apresentou teores de óleo que variaram de 0,2 a 0,6% (Castro *et al.*, 2002; Hennebelle *et al.*, 2006; Glamočlija *et al.*, 2011; Heldwein *et al.*, 2012), enquanto que das folhas secas de 0,4 a 2,8% (Hatano *et al.*, 2012).

O tempo de extração varia de acordo com a espécie, local e estrutura especializada onde se encontra o óleo essencial. No caso de *E. muticus*, a partir dos resultados é possível definir que o tempo de extração mínimo mais adequado para a espécie é de 180 min, já que não apresentou estabilização no volume de óleo extraído em menos tempo, indicando a necessidade de maior período de extração para extrair maiores volumes de óleo (Figura 11). Ehlert *et al.* (2006), avaliaram o tempo de hidrodestilação na extração do óleo essencial de sete espécies medicinais, verificando que cada uma das espécies apresentou rendimento diferente em relação ao tempo de hidrodestilação, havendo uma variação entre 130 a 260 min. Para a espécie *Mentha x Piperita* o tempo de extração do óleo essencial apresentou grande variação, de 60 a 150 min (Souza *et al.*, 2006; Valmorbida *et al.*, 2006), sugerindo a importância de uma avaliação prévia do tempo de extração do óleo essencial para cada espécie, levando em consideração as particularidades do método e aparelho de extração utilizados, visando obter a otimização do processo.

No entanto, o elevado tempo de extração pode afetar a composição química do óleo essencial e o rendimento dos constituintes químicos, como compostos majoritários (Zheljazkov *et al.*, 2013). Estudos mostraram que o tempo de extração afetou a composição do óleo essencial de espécies aromáticas como *Mentha canadensis* L. (Zheljazkov & Astatkie, 2012), *Origanum vulgare* L. (Zheljazkov *et al.*, 2012), *Mentha x piperita* L., *Cymbopogon flexuosus* Steud. E *C. martinii* Roxb. (Cannon *et al.*, 2013). No presente trabalho não foi realizada a análise da composição química do óleo essencial de *E. muticus*.

Alguns autores encontraram respostas individualizadas para cada espécie estudada, não havendo um padrão definido para a produção de óleos essenciais

nas plantas aromáticas (Carvalho-Filho *et al.*, 2006; Ehlert *et al.*, 2006; Blank *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2012). A partir dos resultados inéditos obtidos para *E. muticus* foi possível verificar que a biomassa fresca resultou em maior volume de óleo extraído, no entanto, a biomassa seca resultou em maior rendimento na amostra de 75g. É possível realizar extração em amostras acima de 10g de biomassa e o tempo de extração de 180 minutos apresentou ser o mais adequado para a espécie, realizando a extração pelo método de hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado.

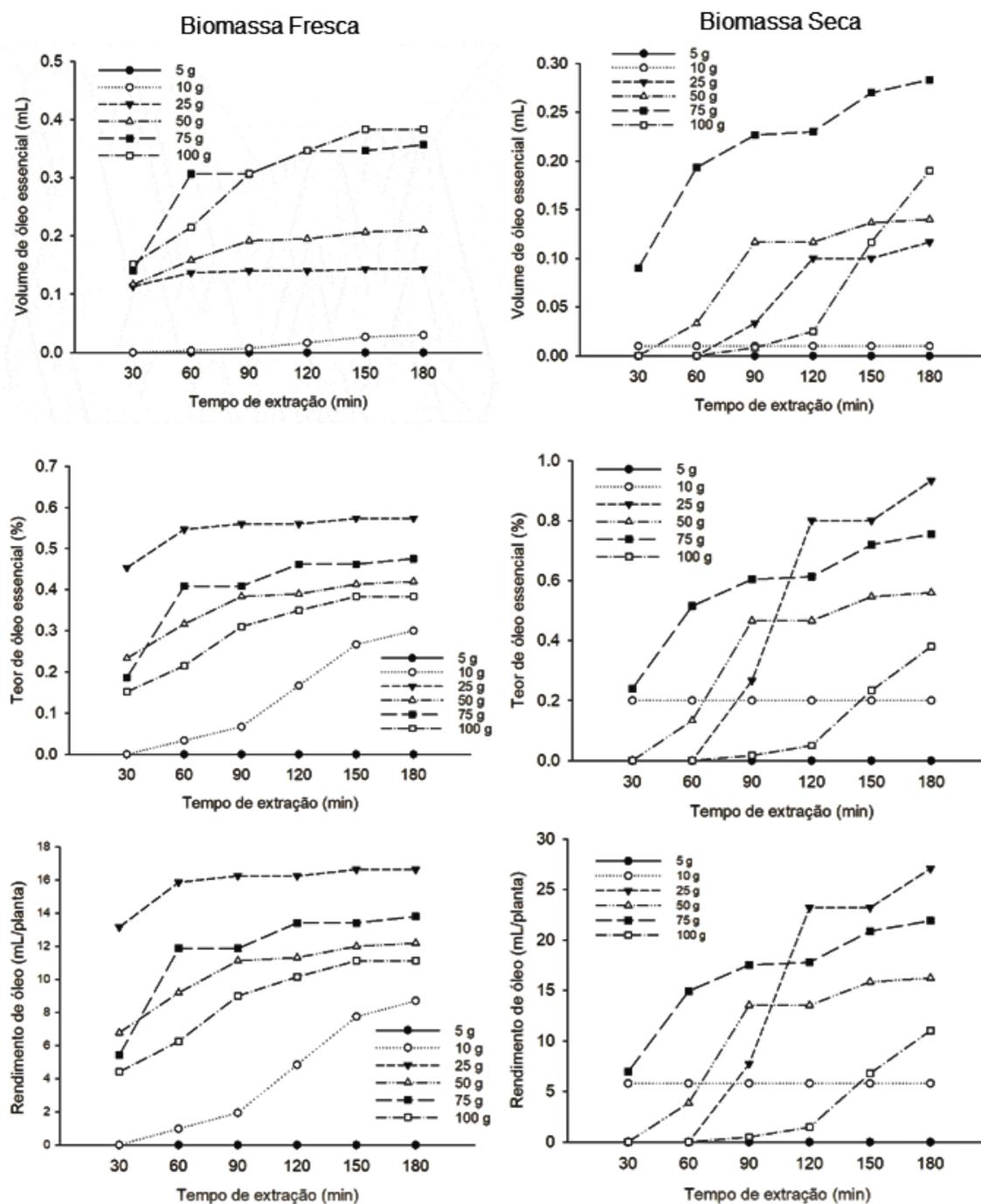


FIGURA 11. Relação tipo de biomassa, peso de biomassa e tempo de extração do óleo essencial de *Elionurus muticus*. Porto Alegre/RS. 2017.

4.7 Avaliação fenotípica dos indivíduos da população

Em espécies aromáticas, produtoras de óleos essenciais, a exploração comercial depende muito da capacidade de produção de biomassa, onde o rendimento de óleo é obtido a partir da massa da planta. Para fins de seleção de indivíduos superiores, a caracterização agrônômica da população serve como ferramenta inicial para selecionar aqueles que apresentam os caracteres desejáveis.

Os caracteres avaliados não apresentaram diferença significativa entre os indivíduos, tanto para o corte de 75 dias, quanto para o corte de 150 dias (Tabela 17). E ao analisar o tempo de corte como um fator, dos mesmos indivíduos, os tempos diferiram significativamente para a variável biomassa, enquanto os indivíduos não diferiram (Tabela 17).

TABELA 17. Resumo da análise de variância da altura e biomassa dos indivíduos de *Elionurus muticus*, população São Borja/RS. Porto Alegre/RS. 2017.

75 dias			
Causas de variação	GL	Variáveis	
		Altura	Biomassa
Quadrado Médio			
Indivíduos	52	227,4 ^{ns}	71,65 ^{ns}
CV (%)		17,6	32,37
150 dias			
Indivíduos	102	434,0 ^{ns}	119,6 ^{ns}
CV (%)		23,49	44,73
Fator: Corte			
Corte	1	851,1 ^{ns}	2660,7 ^{***}
Indivíduos	52	489,7 ^{ns}	148,4 ^{ns}
CorteXIndivíduos	52	157,0 ^{ns}	25,3 ^{ns}
CV (%)		21,67	42,49

*** significativo $\alpha = 0,01$

No corte de 75 dias o indivíduo que teve maior comprimento de parte aérea, altura, foi o SB-29 clone, com 108 cm, enquanto que o indivíduo SB-64 apresentou a menor altura 73 cm. Em relação a produção de biomassa, o indivíduo SB-45-clone foi o maior produtor de biomassa, 39,22 g, e o menor produtor o indivíduo SB-81, 16,03 g. Já no corte de 150 dias o indivíduo que teve maior comprimento de parte aérea e maior produção de biomassa foi o SB-45 clone, com 121 cm de altura e 51,67 gramas, respectivamente, enquanto que o indivíduo SB-21 clone apresentou menor altura e produção de biomassa, com 65 cm e 13,7 gramas, respectivamente (Tabela 18).

TABELA 18. Máxima, mínima e média geral da altura e biomassa da parte aérea de *Elionurus muticus*. Porto Alegre/RS. 2017.

	Altura (cm)		Biomassa (g)	
	75 dias	150 dias	75 dias	150 dias
Nº indivíduos*	53			
Máxima	108	121	39,20	51,7
Mínima	73	65	16,00	13,7
Amplitude	35	56	23,2	38
Desvio Padrão	8,23	11,72	4,90	5,79
Média	91,27 a	94,08 a	23,73 B	29,18 A

Médias seguidas da mesma letra minúscula ou maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). *mesmo indivíduos avaliados nos dois períodos.

O acúmulo de biomassa é o resultado da diferença entre o aumento bruto em massa, devido a formação de novos tecidos, e a diminuição causada pela senescência e decomposição de tecidos mais velhos (Nascimento Junior & Adese, 2004; Füller, 2013). O ponto de colheita é um aspecto fundamental para estudos com plantas medicinais, especialmente no caso de espécies perenes, pois a determinação da melhor época de colheita permite o máximo de aproveitamento pós-colheita do produto vegetal por apresentar melhor qualidade e o mínimo de perdas (Figueiredo *et al.*, 2009).

O tempo ideal para se proceder à colheita de plantas aromáticas varia conforme a espécie, a época do ano, o clima da região e o destino que se dará a planta (Souza *et al.*, 2007). Em espécies de *Mentha sp.*, Gonzaga & Rodrigues (2006) recomendam a primeira colheita das plantas por volta dos 120 dias de idade, e Sacramento & Campos (2002) observaram que o ponto de máxima produção de matéria seca ficou acima dos 135 dias de cultivo, indicando um comportamento característico de planta perene. No caso de *E. muticus*, o tempo de 150 dias diferiu estatisticamente do tempo de 75 dias, tendo uma produção média geral de biomassa fresca da parte aérea de 29,18 e de 23,73g, respectivamente (Tabela 18).

Os aromas, odores, das plantas são determinados por combinações únicas de compostos voláteis (Thomson, 1986; Kuentzel & Bahri, 1991; Schwab *et al.*, 2008; Gonda *et al.*, 2010). A maioria dos compostos voláteis provêm de várias fontes das plantas, de diversas famílias botânicas, e são constituintes majoritários dos óleos essenciais (Schwab *et al.*, 2008). O odor cítrico, atribuído à presença de óleo essencial, é uma variável que tem sido considerada importante na defesa e interação ecológica de plantas (Bakkali *et al.*, 2008, Füller, 2013).

Na avaliação de 75 dias, em média 11% dos indivíduos apresentaram o odor cítrico, enquanto na de 150 dias, 26% apresentaram o odor cítrico. Em geral, essa variável é perceptível na população São Borja, sendo uma característica utilizada como identificação da espécie *E. muticus* (Renvoize, 1978, Rocha *et al.*, 2014). No entanto, quando analisado na população de estudo, apresentou uma variação entre os indivíduos, não sendo perceptível o odor cítrico na maioria dos indivíduos. Esse resultado pode ser influência dos fatores edafoclimáticos, já que também influenciam no metabolismo secundário das espécies aromáticas e medicinais, o

qual têm ligação direta na formação dos produtos químicos do aroma, que são compostos orgânicos com uma estrutura química definida (Schawb *et al.*, 2008; Gonda *et al.*, 2010). Em geral, todas as partes das plantas, como folhas, flores, frutos e raízes, emitem compostos voláteis, que possuem múltiplas funções (Pichersky e Gershenzon, 2002; Schawb *et al.*, 2008), como no papel defensivo e atrativo. No entanto, presume que eles não são essenciais para a sobrevivência da planta, mas fornecem características adaptativas sob forte seleção ambiental (Schawb *et al.*, 2008).

A partir da observação dos caracteres fenotípicos, foram selecionados 11 indivíduos que apresentaram maior produção de biomassa em ambos períodos de corte, para realizar a extração de óleo essencial e avaliar o volume, teor e rendimento do óleo essencial de *E. muticus*.

4.8 Extração de óleo essencial dos indivíduos selecionados

Os resultados de extração de óleo indicaram diferenças estatísticas entre os indivíduos testados, para o volume, teor e rendimento do óleo essencial de *E. muticus* (Tabela 19). O volume de óleo essencial extraído variou de 0,00 a 0,16 mL, o teor de óleo entre 0,00 a 0,52% e o rendimento de óleo entre 0,00 a 7,54 mL/planta. Sendo, o indivíduo SB 45-clone o que apresentou os melhores resultados, 0,16 mL de volume de óleo essencial, teor de 0,52% e rendimento de 7,54 mL/planta. Füller (2013), trabalhando com a mesma população de *E. muticus* oriunda do município de São Borja/RS, também detectou variabilidade no teor de óleo essencial de 56 indivíduos analisados, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo.

TABELA 19. Valores médios de presença ou ausência de odor cítrico, altura de planta, biomassa fresca da parte aérea (g/planta), volume (mL/30g), teor (%) e rendimento (mL/planta) de óleo essencial de 11 indivíduos de *Elionurus muticus*, população São Borja, cultivados em casa de vegetação. Porto Alegre/RS. 2017.

Indivíduo	Odor	Altura (cm)	Biomassa (g)	Óleo essencial		
				Volume (mL)	Teor (%)	Rendimento (mL/planta)
SB-6	0	72,39 (± 18,96) a	42,33(± 14,84) a	0,07(± 0,04) ab	0,22(± 0,14) ab	3,17(± 2,30) ab
SB-7	0	75,26 (± 14,83) a	40,83 (± 11,73) a	0,09(± 0,03) ab	0,32(±0,11) ab	3,76(± 1,45) ab
SB-10	1	94,11(± 15,55) a	32,33 (± 6,03) a	0,10(± 0,04) ab	0,34(± 0,15) ab	3,47(± 1,72) ab
SB-13	1	98,32 (± 24,06) a	33,83 (± 3,40) a	0,13(± 0,09) a	0,42(± 0,29) a	4,28(± 3,13) ab
SB-14	0	91,55 (± 15,40) a	38,00(± 10,00) a	0,09(± 0,03) ab	0,33(± 0,09) ab	3,64(± 1,00) ab
SB-45-clone	1	121,05(± 28,31) a	51,67(± 45,94) a	0,16 (± 0,04) a	0,52(± 0,13) a	7,54(± 7,05) a
SB-55	1	88,93(± 10,16) a	36,00(± 7,21) a	0,16(± 0,04) a	0,52(± 0,13) a	5,66(± 1,85) ab
SB-56	0	88,91 (± 20,79) a	23,00(± 6,08) a	0,00 (± 0,00) b	0,00(± 0,00) b	0,00(± 0,00) b
SB-73	0	83,55(± 17,78) a	29,67(± 8,39) a	0,08(± 0,01) ab	0,27(± 0,02) ab	2,45(± 0,51) ab
SB-77	0	105,86(± 27,89) a	29,67(± 8,74) a	0,15(± 0,08) a	0,51(± 0,28) a	4,69(± 3,05) ab
SB-85	0	79,83 (± 10,33) a	37,33 (± 16,16) a	0,13(± 0,04) a	0,45(± 0,14) a	5,41(± 3,86) ab
CV(%)		21,44	46,81	35,50	35,54	53,47

(± DP- desvio padrão). Médias na coluna seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$)

O conhecimento do rendimento médio de óleo essencial extraído permite mensurar o rendimento de óleo de um número determinado de plantas e assim, verificar a viabilidade econômica da cultura. Considerando o rendimento médio de óleo essencial de *E. muticus* sendo de 4,4 mL/planta, o rendimento aproximado de óleo por área é de 123,2 mL/m², com um retorno financeiro bruto de aproximadamente R\$ 308, 00/m², considerando o preço médio de 10 mL do óleo essencial, rico em citral, de R\$ 25,00.

Os teores de óleo essencial dos indivíduos selecionados foram similares aos teores para espécies do gênero *Elionurus*, onde diversos autores constataram valores da ordem de 0,1 a 0,5% (Chagonda *et al.*, 2000; Mevy *et al.*, 2002; Hess *et al.*, 2007; Füller *et al.*, 2014; Füller *et al.*, 2017). Variação nos teores de óleo têm sido descritos para outras gramíneas como *Vetiveria zizanioides*, de 0,06 a 1,38% (Pripdeevech *et al.*, 2006; Kirici *et al.*, 2011); espécies do gênero *Bothriochloa*, de 0,2 a 3,1% (Kaul & Vats., 1998; Scrivanti *et al.*, 2009) e espécies do gênero *Cymbopogon*, que variam de 0,2 a 1,4% (Chagonda *et al.*, 2000; Castro & Ramos, 2003; Padalia *et al.*, 2011; Gbenou *et al.*, 2012; d'Ávila *et al.*, 2016).

Estudos em *Cymbopogon citratus* demonstraram variação no seu teor de óleo essencial, Figueiredo *et al.* (2006) obtiveram teor de óleo de 0,2 a 0,5%; Costa *et al.* (2008) apresentaram resultados em torno de 1,6%, enquanto Santos *et al.* (2009) valores determinados de 0,49 a 1,15%. *C. citratus* é uma espécie em que o óleo essencial é amplamente empregado como aromatizante, no entanto, seu maior emprego tem sido na indústria farmacêutica, cujo o óleo essencial é usado na síntese da vitamina A e como antisséptico, por sua ação fungistática e fungicida (Garcia *et al.*, 2008), devido ao citral, seu composto majoritário. No estado do Paraná a produção de *C. citratus* ocupa posição de destaque, onde a safra

2007/2008 totalizou 2.029,7 toneladas e o valor bruto da produção agrícola totalizou R\$ 1.045.308,00 (Paraná, 2008; Pinto *et al.*, 2014).

O citral é um composto versátil, que pode ser empregado em vários setores da indústria, inclusive como aditivo alimentar, sendo aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) e utilizado na formulação de aromas. O composto também faz parte do perfil químico do óleo essencial de *E. muticus*, como composto majoritário, tornando a espécie uma fonte alternativa de citral e com grande potencial econômico. Apesar dos trabalhos em *C. citratus* apresentarem valores de rendimento de óleo essencial superiores aos de *E. muticus*, a espécie *C. citratus* apresenta uma baixa produção por hectare, devido a menor resistência ao frio, crescimento mais lento e suscetibilidade à ferrugem da folha (Castro & Ramos, 2003), além disso, sua propagação é exclusivamente vegetativa, por divisão de touceiras (Costa *et al.*, 2008), já que a planta raramente produz flores e sementes (Soto *et al.*, 1984; Silva Júnior, 2003), tornando mais suscetível a incidência de pragas e doenças. E devido a demanda de óleo essencial com conteúdo de citral, torna a espécie *E. muticus* uma alternativa para a extração do óleo essencial.

As variações nos teores e rendimentos de óleo essencial são explicadas pelo fato de que a produção e composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores da planta, além de outros fatores que podem levar a alterações significativas em sua produção, como interações entre plantas, microorganismos, insetos, idade e fase de desenvolvimento da espécie, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, precipitação, nutrição e período e tempo de colheita (Morais, 2009; d'Ávila *et al.*, 2016).

O rendimento de biomassa e óleo essencial apresentou uma correlação positiva significativa ($r = 0,79$), forte, sugerindo que o aumento da biomassa fresca

da parte aérea de *E. muticus* tem relação positiva no aumento no rendimento de óleo essencial (Tabela 20). Houve forte correlação entre o rendimento de óleo essencial e o teor de óleo essencial ($r = 0,71$) e moderada entre altura de planta e biomassa ($r = 0,53$) e altura de planta e rendimento de óleo essencial ($r = 0,55$). Estes resultados estão de acordo com Soluki *et al.* (2008) e Pirkhezri *et al.* (2010) em *Matricaria chamomilla* e com os resultados em *Tanacetum parthenium* (Hamisy *et al.*, 2012) e *T. balsamita* (Alizadeh *et al.*, 2017), onde os teores de óleo essencial e produção de biomassa aérea apresentaram forte correlação positiva. A análise da correlação indica que para fins do melhoramento genético de *E. muticus*, a seleção de indivíduos promissores deve focar no alto rendimento de biomassa da parte aérea, teor e rendimento de óleo essencial.

TABELA 20. Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis analisadas em *Elionurus muticus*[†]. Porto Alegre/RS. 2017.

Variável	Altura (cm)	Biomassa (g)	Vol. de óleo (mL)	Teor de óleo (%)
Biomassa (g)	0,53**	-		
Vol. de óleo (mL)	0,32 ^{ns}	0,18 ^{ns}		
Teor de óleo (%)	0,32 ^{ns}	0,18 ^{ns}	1,00**	
Rend. de óleo (mL/planta)	0,55**	0,79**	0,71**	0,71**

** significativo $\alpha = 0,01$; ns=não significativo. †11 indivíduos avaliados.

5 CONCLUSÕES

A caracterização da inflorescência de *Elionurus muticus* mostrou que a estrutura das espiguetas é tipicamente de espécies da família Poaceae e que, diferentemente de que alguns autores relataram, há presença de pálea na espécie.

O florescimento apresentou um ciclo relativamente curto, tanto para o período de florescimento quanto para os estádios, sendo de aproximadamente 30 dias desde o início da emissão do primórdio floral até a dispersão das sementes.

As sementes de *E. muticus* são pequenas, viáveis e vigorosas. A faixa de temperatura mínima para germinação é entre 10 e 15°C, a máxima a partir de 30°C e a temperatura ótima para a germinação é de 25°C. Além disso, as sementes apresentaram ser fotoblástica neutra, germinando tanto na luz, quanto no escuro.

De acordo com os resultados obtidos, pela análise isoenzimática e através do isolamento das inflorescências, a alogamia preferencial pode ser considerada como sistema reprodutivo da espécie.

A caracterização da propagação vegetativa, através do perfilhamento, mostrou que *E. muticus* apresenta uma elevada taxa de sobrevivência de perfilhos, indiferente do número inicial de perfilhos. E o número de perfilhos não influenciou no resultado final de biomassa.

Para otimizar a extração do óleo essencial de *E. muticus*, através da hidrodestilação, e obter um elevado volume de óleo essencial, deve ser utilizada

biomassa fresca da parte aérea, enquanto que o peso mínimo da amostra deve ser de 25 gramas e quantidades acima de 75 gramas devem ser extraídas em balão volumétrico maior que 1 L. O tempo para a extração do óleo essencial de *E. muticus*, através do método de hidrodestilação, é de no mínimo 180 minutos.

O tempo de corte adequado para a obtenção de maior produção de biomassa da parte aérea foi de 150 dias. E a produção de biomassa apresentou correlação com o rendimento de óleo essencial, através desse resultado é possível selecionar o indivíduo SB-45 clone como provável indivíduo promissor.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACRA, L. A.; CARVALHO, S. M.; CERVI, A.C. Biologia da polinização e da reprodução de *Handrianthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) mattos (Bignoniaceae Juss.). **Estudos de Biologia**, Curitiba, v. 34, n.82, p. 45-49, 2012.

ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242 p.

ALFENAS, A.C (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

ALI, I. B. E. H. et al. A combined approach using allozymes and volatiles for the characterization of Tunisian *Thymbra capitata* (L.) cav. (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 43, p. 477-83, 2013.

ALI, I. B. E. H.; GUETAT, A.; BOUSSAID, M. Genetic diversity, population structure and relationships on Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. Et Reut. and *Thymus capitatus* Hoffm. Et Link. assessed by isozymes. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 149-63, 2012.

ALIZADETH, M.; JAFARI, A. A.; SAYEDIAN, S. E. Evaluation of aerial biomass yield and essential oil content of seven species of *Tanacetum*. **Journal of Horticultural Research**, Warsaw, v. 25, n. 1, p. 19-25, 2017.

ALLARD, R. W. **Princípios de melhoramento de plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381 p.

ALVES, C. Z.; SILVA, J. B.; CANDIDO, A. C. S. Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de goiaba. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n.3, p 615-621, 2015.

AMARO, M. S. et al. Influência da temperatura e regime de luz na germinação de sementes de janaguba (*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n.3, p. 450-457, 2006.

ANDRADE, A. C. S. et al. Germinação de sementes de jenipapo: temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.15, n. 3, p. 609-615, 2000.

ANGELOV, G. B. Isoenzyme diversity and affinity between *Dactylis glomerata* and *Puccinellia maritima* (Poaceae). **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Biology and Ecology**, Tallinn, v. 55, n. 4, p. 267-279, 2006.

ARALDI, R. et al. Florescimento em cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 694-702, 2010.

ARAÚJO, A. A. D. **Principais gramíneas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Sulina, 1971. 255 p.

AOSA - ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigour testing handbook**. East Lansing: AOSA, 2009. 334 p. (Contribution, 32).

AWAN, T. H.; CHAUHAN, B. S.; CRUZ, P. C. S. Influence of environmental factors on the germination of *Urena lobata* L. and its response to herbicides. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. 1-8, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0090305>> Acesso em: 17 dez. 2017.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARHART, S. **How pasture plants grow**. Iowa: Iowa State University, 1999. Disponível em: <<http://www.extension.iastate.edu/Publications/PM1791.pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

BASKIN C.C.; BASKIN J.M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2014. 1600 p.

BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. **Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic Press, 1998. 666 p.

BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013. 392 p.

BLANK, A. F. et al. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, p. 557-564, 2007.

BLANK, A. F. et al. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 113-116, 2004a.

BLANK, A. F. et al. Influência de número de perfilhos e comprimento de folha no plantio de capim-citronela. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 44., 2004, Campo Grande. **Anais ...** Campo Grande: Sociedade de Olericultura do Brasil, 2004b.

BOGDAN, A. V. The selection of tropical ley grasses in Kenia: general consideration and methods. **The East African Agricultural Journal**, Nairobi, v. 24, n. 3, p. 206-217, 1959.

BOLDRINI, I. I.; BOECHAT, S. C. **Morfologia e taxonomia de gramíneas sul-riograndenses**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2008. 88 p.

BOOSE, A. B.; HOLT, J. S. Environmental effects on asexual reproduction in *Arundo donax*. **Weed Research**, Oxford, v. 39, p. 117-127, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária. Mapa/ ACS, 2009. 399 p.

BRISKE, D. D. Developmental morphology and physiology of grasses. In: HEITSCHMIDT, R.K.; STUTH, J.W. (Ed.). **Grazing management: an ecological perspective**. Portland: Timber, 1991. p.85-108. Disponível em: <<http://cnrit.tamu.edu/rlem/textbook/Chapter4.htm#index5>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

BUGLIA, A. G; MING, L. C. Development of *Elionurus latiflorus* Nees as affected by number of tillers. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 18., 2004, Manaus. **Livro de resumos...** Manaus: INPA, 2004. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/44_333.pdf>. Acesso em: 12 de nov. 2017.

CAMÊLO, L. C. A. et al. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de erva cidreira-brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. **Scientia Plena**, São Cristovão, v. 7, n. 5, p. 1-8, 2011.

CÂNDIDO, M. J. D. et al. Morfofisiologia do dossel de *Panicum maximum* cv. Mombaça sob lotação intermitente com três períodos de descanso. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 2, p. 406-415, 2005.

CANNON, J. B. et al. Distillation time modifies yield and composition of peppermint, lemongrass, and palmarosa essential oils. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 41, p. 214–220, 2013.

CARVALHO FILHO, J. L. S. et al. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, p. 24-30, 2006.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.

CASSEL, E. et al. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops Products**, Amsterdam, v. 29, p. 171-176, 2009.

CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas da *Lippia alba* (Mill). N.E.Br em diferentes épocas de

colheita e partes do ramo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 4, n. 2, p. 75-79, 2002.

CASTRO, H. G. et al. **Contribuição ao estudo de plantas medicinais: metabólitos secundários**. Viçosa: UFV, 2004.

CASTRO, L. O.; RAMOS, E. L. D. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., capim-cidró, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J.F. Watson, palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack, capim-limão, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, vetiver. **Boletim FEPAGRO**, Porto Alegre, n. 11, 2003.

CHAGONDA, L. S.; MAKANDA, C.; CHALCHAT, J. The essential oils of wild and cultivated *Cymbopogon validus* (Stapf) Stapf ex Burt Davy and *Elionurus muticus* (Spreng.) Kunth from Zimbabwe. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 15, p. 100-104, 2000.

CHAUHAN, B. S. Germination biology of *Hibiscus tridactylites* in Australia and the implications for weed management. **Scientific Reports**, London, v. 6, [art.] 26006, 2016.

CHIARI, L.; RESENDE, R. M. S.; MATIDA, E. T. Mating system parameters in *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) SW. based on RAPD markers. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 9, n. 36, p. 5820-5822, 2010.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, London, v. 86, p. 60-67, 2001.

CORRÊA, R.M. et al. Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes métodos de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, p. 339-344, 2004.

COSTA, G. A.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; DESCHAMPS, C. Rendimento e composição do óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin*) conforme o tempo de extração. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 15, n. 3, p. 319-324, 2013.

COSTA, L. C. B. et al. Efeito da adubação química e orgânica na produção de biomassa e óleo essencial em capim-limão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 10, p. 16-20, 2008.

CULLEY, T. M.; WELLER, S. G.; SAKAI, A. The evolution of wind pollination in angiosperms. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 17, n. 8, p. 361-369, 2002.

D'ÁVILA, J.V. et al. Essential oil production of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) under organic compost containing sewage sludge. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campinas, v. 20, n. 9, p. 811-816, 2016.

D'EÇA-NEVES, F. F.; MORELLATO, L. P. C. Métodos de amostragem e avaliação utilizados em estudos fenológicos de florestas tropicais. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 18, n. 1, p. 99-108, 2004.

DAVID, E.F.S.; BOARO, C. S. F.; MARQUES, M. O. M. Rendimento e composição do óleo essencial de *Mentha piperita* L., cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 8, p. 183-188, 2006.

DAWIDOWICZ, A. L. et al. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. **Talanta**, Amsterdam, v. 76, n.4, p. 78-884, 2008.

DÓREA, M. C. **Morfologia polínica, fenologia reprodutiva e biologia floral de espécies florestais de Poaceae**. 2011. 166 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

DOUSSEAU, S. et al. Germinação de sementes de tanchagem (*Plantago tomentosa* Lam.): influência da temperatura, luz e substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 438-443, 2008.

EHLERT, P. A. D. et al. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 8, n. 2, p. 79-80, 2006.

EL-KEBLAWY, A. Light and temperature requirements during germination of potential perennial grasses for rehabilitation of degraded sandy arabian deserts. **Land Degradation & Development**, Chichester, v. 28, n. 5, p. 1687-1695, 2017.

EL-KEBLAWY, A. Germination response to light and temperature in eight annual grasses from disturbed and natural habitats of an arid Arabian desert. **Journal of Arid Environments**, London, v. 147, p. 17-24, 2017b.

ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 24, p. 217-242, 1993.

FAGUNDES, J. L. et al. Características morfogênicas e estruturais do capim-braquiária em pastagem adubada com nitrogênio avaliadas nas quatro estações do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 21-29, 2006.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genéticos-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina-DF: EMBRAPA Cerrados, 2007. 102 p.

FARON, M. L. B. et al. Temperatura, nitrato de potássio e fotoperíodo na germinação de sementes de *Hypericum perforatum* L. e *H. brasiliense* Choisy. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 193-199, 2004.

FERREIRA, A. G.; ROSA, S. G. T. Germinação de sementes de sete espécies medicinais nativas do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 11, n. 3, p. 230-235, 2009.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220 p.

FIGUEIREDO, L. S. et al. Influência do ácido indolbutírico no enraizamento de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) em leito com umidade controlada. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 33-36, 2009.

FILGUEIRAS, T.S. Gramíneas dos estados de Goiás e Tocantins. In: RIZZO, J. A. **Flora dos Estados de Goiás e Tocantins**. Goiânia: UFG, 1995. v. 17, p. 1-143.

FLORES, J. et al. Seeds photoblastism and its relationship with some plant traits in 136 cacti taxa. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 79–88, 2011.

FRIEDMAN, J.; BARRETT, S. C. Wind of change: new insights on the ecology and evolution of pollination and mating in wind-pollinated plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 9, p. 1515-1527, 2009.

FRYXEL, P. Mode of reproduction of higher plants. **Botanical Review**, Bronx, v. 23, n. 3, p. 135-233, 1957.

FÜLLER, T. N. et al. Phenotypical, phytochemical and molecular characterization of “capim-carona” [*Elionurus muticus* (Spreng.) Kuntzel] populations. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 261-268, 2010.

FÜLLER, T. N. **Caracterização genética e química e atividade biológica do óleo essencial de populações naturais de *Elionurus muticus* Hum. & Bompl Ex Willd.** 2013. 114 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

FÜLLER, T. N. et al. *Elionurus muticus* as an alternative source of citral from pampa biome. **Journal of Oleo Science**, Tokyo, v. 63, n. 11, p. 1109-1116, 2014.

FÜLLER, T. N. et al. Genetic and cytogenetic structure of wild lemon grass (*Elionurus muticus*) population. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.15, p. 272-277, 2015.

FÜLLER, T. N. et al. Chemical diversity of wild populations of *Elionurus muticus* (Spreng.) and the allelopathic effect of its essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, Wheaton, v. 29, n. 6, p. 499-506, 2017.

GALÍNDEZ, G. et al. Alternating temperature combined with darkness resets base temperature for germination (T_b) in photoblastic seeds of *Lippia* and *Aloysia* (Verbenaceae). **Plant Biology**, Stuttgart, v. 19, n. 1, p. 1-20, 2016.

GALÍNDEZ, G. et al. Seed mass and germination in Asteraceae species of Argentina. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 37, n. 3, p. 786–790, 2009.

GARCIA, R. et al. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 163-68, 2008.

GARWOOD, N. C. Seed germination in a seasonal tropical forest in Panama: a community study. **Ecological Monographs**, Washington, v. 53, n.2, p. 59-181, 1983.

GBENOU, J. D. et al. Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on wistar rats. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 40, n. 2, p. 1127-1134, 2012.

GIUDICE NETO, J.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade genética de uma população “*ex situ*” de *Caesalpinia echinata* Lam. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 69, p. 25-133, 2005.

GLĄB, T.; SADOWSKA, U.; ŻABIŃKI, A. Application of image analysis for grass tillering determination. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 187, n. 11, p. 674, 2015.

GLAMOČLIJA, J. et al. Chemical characterization of *Lippia alba* essential oil: an alternative to control green molds. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 4, p. 1537–1546, 2011.

GLAUBITZ, J. C.; MORAN, G. F. Genetic tools: the use of biochemical and molecular markers. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. New York: CABI, 2000. p. 39-59.

GOIS, I. B.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A. Variabilidade genética de *Spondias lutea* L. em uma população do Baixo São Francisco sergipano, por meio de isoenzimas. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 81, p. 55-60, 2009.

GONÇALVES, A. C. et al. Conservação de *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae) baseada na estrutura genética de populações naturais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 1, p. 95-101, 2010.

GONÇALVES, G. G.; MANCINELLI, R. C.; MORAIS, L. A. S. Influência do horário de corte no rendimento de óleo essencial de alfavaquinha e alecrim. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 108-112, 2009.

GONDA, I. et al. Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 4, p. 1111–1123, 2010.

GONZAGA, D. S. O. M.; RODRIGUES, V. G. **Hortelã-pimenta: *Mentha piperita* L.** Porto Velho: EMBRAPA, 2006. (Plantas Mediciniais, 9). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100662/1/folder-hortela_pimenta.pdf>. Acesso em: 5 jan. 2018.

GOUDET, J. **FSTAT**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: Institute of Ecology, University of Lausanne, 2002. Disponível em: <<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

GUEDES, R. S. et al. Testes de vigor na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Erythrina velutina* Willd. (Fabaceae- Papilinoideae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 5, p. 360-1365, 2009.

GUSSON, E.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em populações de *Escweilera ovata* (cambess.) miers. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 491-502, 2006.

HAMISY, M. et al. Effects of different amounts of nitrogen, phosphor and bovine fertilizers on essential oil content and composition of *Tanacetum parthenium*. **Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, Tehran, v. 28, n. 3, p. 399-410, 2012.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROW, A. H. D. et al. **Plant population genetics, breeding and germoplasm resources**. Sunderland: Sinauer Associates, 1989. p. 43-63.

HATANO, V. Y. et al. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 45, n. 3, p. 238-243, 2012.

HE, W. M.; ZHANG, H.; DONG, M. Plasticity in fitness and fitness-related traits at ramet and genet levels in a tillering grass *Panicum miliaceum* under patchy soil nutrients. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 172, n.1, p. 1-10, 2004.

HEIDE, O.M. Effects of photoperiod and temperature on growth and flowering in Norwegian and British timothy cultivars (*Phleum pratense* L.). **Acta Agriculturae Scandinavica**, Stockholm, v. 32, p. 241-252, 1982.

HELDWEIN, C. G. et al. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 45, n. 5, p. 436–43, 2012.

HENNEBELLE, T. et al. The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from French overseas departments and review of previous works. **Chemistry and Biodiversity**, Zurich, v. 3, n. 10, p. 1116–25, 2006.

HESS, S. C. et al. Evaluation of seasonal changes in chemical composition and antibacterial activity of *Elyonurus muticus* (Sprengel) O. Kuntze (Gramineae). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 370-373, 2007.

HEYDECKER, W. Stress and seed germination: an agronomic view. In: KHAN, A. **The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination**. Amsterdam: Elsevier, 1977. p. 237-282.

HOUSE, A. P. N.; BELL, J. C. Isozyme variation and mating system in *Eucalyptus urophylla* ST Blake. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 43, n. 2/3, p. 167-179, 1994.

JUDZIEWICZ, E. Family 187, Poaceae. In: GOORTS-VAN RIJN, A.R.A. Goorts-Van Rijn (Ed.) **Flora of the Guianas**. Koenigstein: Koeltz, 1991. 727 p.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 1099-1106, 2007.

KARASAWA, M. M. G. **Diversidades reprodutivas de plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2009. 113p.

KAUL, K. V.; VATS, S. K. Essential oil composition of *Bothrichloa pertusa* and phyletic relationship in aromatic grasses. **Biochemical Systematics and Ecology**, Amsterdam, v. 26, p. 347-356, 1998.

KENDRICKS, R. E.; FRANKLAND, B. **Phytochrome and plant growth**. 2. ed. London: United Kingdom, 1983. 76 p.

KIRICI, S. et al. Study of essential oil and agricultural properties of vetiver (*Vetiveria zizanioides*) in the Southeastern of Mediterranean. **Advances in Environmental Biology**, Jordan, v. 5, n. 2, p. 447-451, 2011.

KLUSE, J. S.; DIAZ, B. A. Importance of soil moisture and its interaction with competition and clipping for two montane meadow grasses. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 176, p. 87-99, 2005.

KOSHIMA, F. A. T.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Produção de biomassa, rendimento de óleo essencial e de citral em capim-limão, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, com cobertura morta nas estações do ano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 8, p. 112-116, 2006.

KUENTZEL, H.; BAHRI, D. Synthetic ingredients of food flavourings. In: ASHURST P. R. (Ed.) **Food flavorings**. Boston: Springer, 1991. p.116-159.

LABOURIAU, L. G. **A germinação de sementes**. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983, 173 p.

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 263-284, 1976.

LANGER, R. H. M. Growth and nutrition of timothy (*Phleum pratense*) 1. The life history of individual tillers. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 44, p. 166-187, 1956.

LEAL, T. C. A. d. B. **Produção de óleo essencial de capim cidreira (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) em função de fatores endógenos e exógenos**. 1998. 64 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ, 1998.

LEMES, M. R. et al. Flexible mating system in a logged population of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae): implications for the management of a threatened neotropical tree species. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 192, p.169-179, 2007.

LONGHI-WAGNER, H. M. Poaceae In: WANDERLEY, M. G. L. (Ed.) et al. **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2001. v. 1, p. 1-281.

LONGHI-WAGNER, H. M.; WELKER, C. A. D. Diversity, chorology and conservation of the grasses (Poaceae) in Serra do Ouro Branco, State of Minas Gerais, Brasil. **Phytotaxa**, Auckland, v. 65, p.7-22, 2012.

LOPES, R. C. et al. Caracterização isoenzimática de oito acessos de erva-de-bicho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 433-437, 2003.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MAJEROWICZ, N.; PERES, L. E. P. Fotomorfogênese em plantas. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. p. 421-438.

MANDAL, A. K.; ENNOS, E. A. Mating system analysis in a natural population of *Acacia nilotica* subspecies kraussiana. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 79, n. 3, p. 235-240, 1995.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina: ABRATES, 2015. 660 p.

MARQUES, D. S. **Germinação de sementes de *Passiflora setacea* DC**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado) – Área de Concentração Fisiologia Vegetal. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. Botucatu-SP, 2009.

MARTINS, C. C. et al. Isoenzimas na diferenciação de sementes de três espécies do gênero *Euterpe*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 51-57, 2007.

MASCIA-VIEIRA, D.C.; SOCOLOWSKI, F.; TAKAKI, M. Germinação de sementes de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas em luz e escuro. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 183-188, 2007.

MATHEUS, M. T.; LOPES, J. C. Temperaturas cardinais para a germinação de sementes de *Erythrina variegata* L. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 115-122. 2009.

MELO, J. C. et al. Preferência de forragem de Capim-Marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) manejado sob lotação intermitente e submetido à doses de nitrogênio na Amazônia legal. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 2713-2726, 2015.

MELO, K. N. M et al. Estudo da germinação de sementes de *Aster squamatus* (Spreng.) Hiero. e *Pterocaulon polystachyum* DC. **Revista Científica Rural**, Bagé-RS, v. 18, n. 1, p. 29-41, 2016.

MELO, M. T. P. **Conservação de *Lippia sidoides* do norte de Minas Gerais e Vale do Jequitinhonha**: localização, coleta, ecogeografia, crescimento, modo de reprodução e divergência genética. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado) -Área de Concentração em Agroecologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros- MG, 2012.

MENEZES, N. L. et al. Germinação de sementes de *Salvia splendens* Sellow em diferentes temperaturas e qualidades de luz. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 32-37, 2004.

MENGES, E. S. Seed germination percentage increases with population size in a fragmented prairie species. **Conservation Biology**, Boston, v. 5, p. 158-164, 1991.

MEVY, J. P. et al. Composition and some biological activities of the essential oils from an african pasture grass: *Elionurus elegans* Kunth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 4240–4243, 2002.

MILBERG, P. L.; ANDERSSON, L.; THOMPSON, K. Large-seeded species are less dependent on light for germination than small-seeded ones. **Seed Science Research**, Wageningen, v.10, n. 1, p. 99-104, 2000.

MILLACH, S. C. K; Marcadores de DNA: aplicações no melhoramento de plantas. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 5, p. 14-17, 1998.

MILLAR, M. A. et al. Mating system studies in jarrah, *Eucalyptus marginata* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 48, n. 4, p. 475-479, 2000.

MIRANDA, V. C. **Influências de condições de secagem, sombreamento, horário de colheita e procedência das plantas sobre o teor de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf**. 2012. 53 f. Dissertação (Mestrado) -

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2012.

MONTAGNA, T. et al. **Manual de eletroforese de isoenzimas**: versão 2013. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, 2013. 39 p.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. S4050-S4063, 2009.

MORAIS, O. P. et al. Melhoramento genético. In: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. p. 289-358.

MORELLATO, L. P.C.; LEITÃO, H. F. **Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana**: Reserva de Santa Genebra. Campinas: UNICAMP, 1995. 136 p.

MUCHUGI, A. et al. Estimation of out-crossing rate in natural breeding population of *Warburgia ugandensis* using AFLP marker. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 7, n. 2, p. 139-146, 2008.

MUCHUWETI, M. et al. Total phenolic content and antioxidant activity in selected medicinal plants of Zimbabwe. **International Journal of Food Science and Technology**, London, v. 41, p. 33-38, 2006.

MURAWSKI, D. A.; HAMRICK, J. L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, London, v. 67, p. 167-174, 1991.

MWALE, S. S. et al. Effect of temperature on the germination of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, p. 565-571, 1994.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1999. p.49-85.

NASCIMENTO JÚNIOR, D.; ADESE, B. Acúmulo de biomassa na pastagem. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 2., 2004, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa: UFV, 2004. p. 289-330.

NEGREIROS, J. R. S. et al. Yield of essential oil and safrole content based on fresh and dry biomass of long pepper in the Brazilian Amazon. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 45, n. 1, p. 75-80, 2015.

NG, C. H. et al. Mating system and seed variation of *Acacia hybrid* (*A. mangium* X *A. auriculiformis*). **Journal of Genetics**, London, v. 88, p. 25-31, 2009.

NUNES, A. C. G. S. **Coleta, prospecção em herbários e estudos sobre propagação vegetativa de capim limão (*Elionurus* sp.)**. 2008. 99 f. Dissertação

(Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

OJA, T. Isozyme evidence on the genetic diversity, mating system and evolution of *Bromus intermedius* (Poaceae). **Plant Systematic and Evolution**, Heidelberg, v. 254, p. 199-208, 2005.

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, D.; ROSADO, S. C. S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifeira langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 331-338, 2002.

OLIVEIRA, A. R. M. F. et al. Determinação do tempo de hidrodestilação e do horário de colheita no óleo essencial de menta. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 155-159, 2012.

OLIVEIRA, J. E. Z.; AMARAL, C. L. F.; CASALI, V. W. D. Recursos genéticos e perspectivas de melhoramento de plantas medicinais. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa, 1999. Disponível: <<http://www.cpatia.embrapa.br/catalogo/livrorg/medicinaismelhoramento.pdf>> Acesso em: 15 dez. 2017.

ORTEGA-BAES, P. et al. Are cactus growth forms related to germination responses to light? A test using *Echinopsis* species. **Acta Oecologica**, Paris, v. 36, p. 339-342, 2010.

OZASLAN, C. et al. Germination biology of two invasive *Physalis* species and implications for their management in arid and semi-arid regions. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 16960, p. 1-12, 2017. Disponível: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-17169-5>> Acesso em: 5 jan. 2018.

PACE, C. D.; QUALSET, C. O. Mating system and genetic differentiation in *Dasypyrum villosum* (Poaceae) in Italy. **Plant Systematic and Evolution**, Heidelberg, v. 197, p. 123-147, 1995.

PADALIA, R. C. et al. Chemical fingerprinting of the fragrant volatiles of nineteen indian cultivars of *Cymbopogon* Spreng. (Poaceae). **Record of Natural Products**, Gebze, v. 5, n. 4, p. 290-299, 2011.

PAGGI, G. M. et al. Limited pollen flow and high selfing rates toward geographic range limit in an Atlantic forest bromeliad. **Flora**, Jena, v. 211, p. 1-10, 2015.

PARANÁ (Estado). Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. Departamento de Economia Rural. **Levantamento do valor bruto da produção agropecuária: produtos especiais: safra 2007/2008**. Curitiba: SEAB, 2008. 17 p.

PAVIANI, L. C. **Extração com CO₂ a altas pressões e fracionamento do óleo essencial de capim-limão utilizando peneiras moleculares**. 2004. 92 f.

Dissertação (Mestrado) – Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim-RS, 2004.

PEARSON, T.R.H. et al. Functional significance of photoblastic germination in neotropical pioneer trees: a seed's eye view. **Functional Ecology**, Londres, v. 17, p. 398-402, 2003.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 237–243, 2002.

PINTO, D. A. et al. Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus* DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 54-61, 2014.

PINTO, R. J. B. Sistemas reprodutivos nas espécies cultivadas. In. PINTO, R. J. B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. 2. ed. Maringá: Eduem, 2009. 351 p.

PINTO, S. I. C.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifeira langsdorfii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 64, p. 40-48, 2004.

PIRKHEZRI, M.; HASSANI, M. E.; HADIAN, J. Genetic diversity in different populations of *Matricaria chamomilla* L. growing in Southwest of Iran, based on morphological and RAPD markers. **Research Journal of Medicinal Plant**, New York, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2010.

PRIPDEEVECH, P. S.; WONGPORNCHAI, S.; PROMSIRI, A. Highly volatile constituents of *Vetiveria zizanioides* roots grown under different cultivation conditions. **Molecules**, Basel, v. 11, n. 10, p. 817-826, 2006.

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2016. Disponível:< <https://www.R-project.org/>> Acesso em: 3 out. 2016.

RAHIMMALEK, M.; GOLI, S.A.H. Evaluation of six drying treatments with respect to essential oil yield, composition and color characteristics of *Thymys daenensis* subsp. *daenensis*. Celakleaves. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, V. 42, p. 613-619, 2013.

RAMOS, M. B. P.; VARELA, V. P. Efeito da temperatura e do substrato sobre a germinação de sementes de visgueiro igapó (*Parkia discolor* Benth) Leguminosae, Mimosoideae. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 39, p. 123-133, 2003.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, Cary, v. 86, p. 248-249, 1995.

RECH, A. R. et al. **Biologia da polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014. 527 p.

RENVOIZE, S. A. **Studies in Elionurus (Gramineae)**. Kew Bulletin, London, v. 32, n. 3, p. 665-678, 1978.

RIBAS, L. A. **Diversidade genética e sistema de cruzamento em populações naturais de duas espécies pioneiras arbóreas**. 2003. 102 f. Tese (Doutorado) - Área de Concentração Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP, 2003.

RIBAS, L. A.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de cruzamento de *Trema micrantha* (L.) B. em fragmentos florestais. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 72, p. 29-37, 2006.

RITLAND, K.; JAIN, S. K. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, London, v. 47, p. 35-52, 1981.

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution: international journal of organic evolution**, Lancaster, v. 43, n. 4, p. 848-859, 1989.

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity**, London, v. 88, n. 221-228, 2002.

RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR (Software). Version 3.2**. 2008. Disponível em: <<http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>> Acesso em: 24 jul. 2017.

RITLAND, K.; EL-KASSABY, Y.A. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas fir as shown by an efficient multilocus model. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 71, n. 3, p. 375-384, 1985.

ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. p. 328-67.

ROCHA, A. E. S.; MIRANDA, I. S.; COSTA NETO, S. V. Composição florística e chave de identificação das Poaceae ocorrentes nas savanas costeiras amazônicas, Brasil. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 44, n. 3, p. 301-314, 2014.

ROSA, S. G. T.; FERREIRA, A. G. Germinação de sementes de plantas medicinais lenhosas. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 147-154, 2001.

ROSENGURTT, B.; ARRILAGA DE MAFFEI, B.; IZAGUIRRE DE ARTUCIO, P. **Gramíneas uruguayas**. Montevideo: Departamento de Publicaciones de la Universidad de la Republica, 1970. 489 p.

ROSSI, P.; VENDRAMIN, G. G.; GIANNINI, R. Estimation of mating system parameters in two Italian natural populations of *Fagus sylvatica*. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 26, n. 7, p. 1187-1192, 1996.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 8, n. 103-106, 2008.

RYLE, G. A.; LANGER, R. M. Studies on the physiology of flowering of timothy (*Phleum pratense* L.) I. Influence of daylength and temperature on initiation and differentiation of the inflorescence. **Annals of Botany**, Oxford, v.27, p.213-229, 1963.

SACRAMENTO, L. V. S.; CAMPOS, M. J. B. Cultivo de hortelã: produção de matéria seca e marcha de absorção de cálcio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42., 2002, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia: SOB, 2002.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 3-21, 2001.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. **Análise da germinação**: um enfoque estatístico. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2004. 248 p.

SANT'ANA, T. C. P. **Caracterização de germoplasma e armazenamento de patchouli (*Pogostemon* sp.)**. 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2009.

SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. citratus* em função de sazonalidade e consorciamento. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 19, p. 436-441, 2009.

SANTOS, A. S. et al. **Descrição de sistemas e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Belém: Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, 2004. p. 1-6. (Comunicado Técnico, 99).

SANTOS, S. R. G.; PAULA, R. C. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes *Sebastiania commersoniana* (Bail) Smith & Downs - Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 136-145, 2005.

SCHEFFER, M.C. Roteiro para estudos de aspectos agronômicos das plantas medicinais selecionadas pela fitoterapia do SUSPR/CEMEPR. **Sob Informa**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 29-31, 1992.

SCHMIDT, R.; LONGHI-WAGNER, H. M. A tribo Bambuseae (Poaceae, Bambusoideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, p. 71-128, 2009.

SCHOCKEN, N. R. L. **Obtenção de químiotipos híbridos de *Lippia alba* (MILL) N.E. Brown**. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Área de Concentração em

Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2007.

SCHWAB, W.; DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; LEWINSOHN, E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, Oxford, v. 54, p. 712-732, 2008.

SCOTT, K. et al. Soil seed banks confer resilience to savanna grass-layer plants during seasonal disturbance. **Acta Oecologica**, Paris, v. 36, p. 202-210, 2010.

SCRIVANTI, L. R.; ANTON, A. M.; ZYGADLO, J. A. Essential oil composition of *Bothriochloa* Kuntze (Poaceae) from South America and their chemotaxonomy. **Biochemical Systematics and Ecology**, Amsterdam, v. 37, n. 3, p. 206-213, 2009.

SELLAMI, I.H. et al. Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. **Food Chemistry**, London, v. 126, n. 2, p. 691-697, 2011.

SILVA JUNIOR, A. A. **Essentia herba-Plantas bioativas**. Florianópolis: EPAGRI, 2003. 441p.

SILVA, J. F.; ATAROFF, M. Phenology, seed crop and germination of coexisting grass species from a tropical savanna in Western Venezuela. **Acta Oecologica**, Paris, v. 6, n. 20, p. 41-51, 1985.

SILVERIA, L. R. M.; MORAES, C. F. Detection of the mode of reproduction in molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) by enzyme patterns. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 39-44, 1996.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. (Org.) et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2000. p. 387-415.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 1999, 416 p.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2007, 1104 p.

SKALOVA, H. Potential and constraints for grasses to cope with spatially heterogeneous radiation environments. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 206, p. 115–125, 2010.

SMITH, L. B. et al. **Flora ilustrada catarinense (Gram.)**. Itajai: Herbário Barbosa Rodrigues, 1982, 1407 p.

SOBIERAJSKI, G. R.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em nove populações de *Mimosa scabrella* Bentham (Leguminosaceae). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 71, p. 37-49, 2006.

SOENGAS, P. et al. Mating system of *Brassica napus* and its relationship with morphological and ecological parameters in Northwestern Spain. **Journal of Heredity**, Cary, v. 104, n. 4, p. 491-499, 2013.

SOLUKI, M. H. et al. Study of genetic diversity in chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 117, n. 3, p. 281-287, 2008.

SOTO, R.; VEJA, G.; BARRIOS, A. Método para el cálculo del área foliar em Caña santa (*C. citratus*). **Revista Ciência Técnica MINIL**, [S. l.], v. 2, n. 5, p. 39-41, 1984.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 17, n. 3, p. 495-503, 2015.

SOUZA, G. S. et al. Crescimento, produção de biomassa e aspectos fisiológicos de plantas de *Mentha piperita* L. cultivadas sob diferentes doses de fósforo e malhas coloridas. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, São Cristovão, v. 12, n. 1, p. 36-42, 2012.

SOUZA, M. A. A. et al. Produção de biomassa e óleo essencial de hortelã em hidroponia em função de nitrogênio e fósforo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 41-48, 2007.

SOUZA, W. P. et al. Avaliação do teor e da composição química de óleo essencial de *Mentha piperita* (L.) Huds durante o período diurno em cultivo hidropônico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 8, p. 108-111, 2006.

TAKAKI, F.M.T. New proposal of classification of seeds on forms based on forms of phytochrome instead of photoblastism. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 13, p. 103-107, 2001.

TAKROUNI, M. M. et al. Genetic variability of Tunisian wild strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) populations interfered from iszyme markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 146, p. 92-98, 2012.

THOMSON, D. M. H. The meaning of flavor. In: BIRCH, G.G.; LINDLEY, M. G. (Ed.). **Developments in food flavours**. New York: Elsevier, 1986. p. 1-22.

VALLS, J.F.M. Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENETICOS, 1., 1988, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1988. p. 106-128.

VALMORBIDA, J. et al. Rendimento e composição química de óleos essenciais de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes concentrações e potássio. **Revista brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 8, p. 56-61, 2006.

VASSALO, L. M.; ALTISENTI, J. M. D. Viabilidad, germinacion y vigor: tres conceptos distintos para un mismo lote de sementes. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE SEMILLAS, 3., 1991, Sevilla. [**Anales...**]. Sevilla, 1991. p.1-13.

VÁZQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 24, n. p. 69–87, 1993.

VEENENDAAL, E. M.; ERNST, W. H. O.; MODISE, G. S. Effect of seasonal rainfall pattern on seedling emergence and establishment of grasses in a savana in south-eastern Botswana. **Journal of Arid Environments**, London, v. 32, n. 3, p. 305-317, 1996.

VEENENDAAL, E. M.; ERNST, W. H. O. Dormancy patterns in accessions of caryopses from savanna grass species in South Eastern Botswana. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v. 40, p. 297-309, 1991.

VEGETTI, A. C.; ANTÓN, A. M. Estructura del diseminulo em especies de Andropogoneae (Poaceae). **Anales Jardín Botánico de Madrid**, Madrid, v. 56, n. 1, p. 95-106, 1998.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The grass genera of the world**. 2 ed. Wallingford: CAB International, 1994, 1081 p.

WELKER, C. A. D.; LONGHI-WAGNER, H. M. A família Poaceae no Morro Santana, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 4, p. 53-92, 2007.

WILLIS, K. J.; MCELWAIN, J. C. **The evolution of plants**. Oxford: Oxford University, 2002. 378 p.

YUSOFF, Z. M. et al. **Characterization of down-flowing steam distillation system using step test analysis**. [S.I.]: IEEE Control and System Graduate Research Colloquium, 2011. p. 197-201.

ZAMBIASI, C. A. **Qualidade de grãos de feijão armazenados em diferentes condições de temperatura**. 2015. 77 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2015.

ZHELJAZKOV, V. D.; ASTATKIE, T. Effect of distillation time on *Mentha canadensis* essential oil yield and composition. **HortScience**, Alexandria, v. 47, p. 643-647, 2012.

ZHELJAZKOV, V. D.; ASTATKIE, T.; SCHLEGEL, V. Distillation time changes oregano essential oil yields and composition but not the antioxidant or antimicrobial activities. **HortScience**, Alexandria, v. 47, n. 6, p. 777–784, 2012.

ZHELJAZKOV, V. D. et al. Distillation time effect on essential oil yield, composition, and antioxidant capacity of Sweet Sagewort (*Artemisia annua* L.) oil. **HortScience**, Alexandria, v. 48, n. 10, p. 1288-1292, 2013.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia desynerica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR.** 2002. 130 f. Tese (Doutorado) - Área de Concentração em Genética e Melhoramento Vegetal, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2002.

ZULOAGA, F. O. et al. **Catalogue of New World Grasses (Poaceae): III subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae and Danthonioideae.** Washington, D.C.: Department of Systematic Biology-Botany, National Museum of Natural History, 2003. v. 46, p. 1-662.